# Über zwei prolinspezifische Peptidasen aus Schweineniere: Isolierung und Spezifitätsuntersuchungen

Hubert Mayer

1972

# ÜBER ZWEI PROLINSPEZIFISCHE PEPTIDASEN AUS SCHWEINENIERE: ISOLIERUNG UND SPEZIFITÄTSUNTERSUCHUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Hubert Mayer
aus
Ehekirchen

München 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Kühn
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Autrum

Tag der mündlichen Prüfung: 7. 6. 1972

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1968 bis August 1971 am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Klaus Kühn und
Herrn Professor Dr. Hansjochem Autrum

danke ich für das mir entgegengebrachte Wohlwollen.

Für sein Interesse und seine Diskussionen möchte ich

Herrn Dr. Arnold Nordwig

danken.

Frau E. Evertz danke ich für ihre zuverlässige und geschickte experimentelle Mitarbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546014_0048

# I N H A L T S V E R Z E I C H N I S


| | Seite |
|---|---|
| EINLEITUNG | 4 |
| AUFGABENSTELLUNG | 7 |
| ERGEBNISSE | 8 |
| A. Reinigung der Prolinase | 8 |
| 1. Bestimmung der spezifischen Aktivität | 8 |
| 1.1. Enzymtest | 8 |
| 1.2. Proteinbestimmung | 10 |
| 2. Reinigungsgang | 11 |
| 2.1. Homogenisieren | 11 |
| 2.2. Fällung mit Cetyltrimethylammoniumbromid | 12 |
| 2.3. Reinigung an DEAE-Cellulose | 13 |
| 2.4. Fraktionierte Fällung mit Äthanol | 15 |
| 2.5. Rechromatographie an DEAE-Cellulose | 16 |
| 2.6. Fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat | 17 |
| 2.7. Gelfiltration an Sephadex G-200 | 18 |
| 2.8. Chromatographie an QAE-Sephadex | 19 |
| 2.9. Zusammenfassung der Reinigungsergebnisse | 21 |
| 3. Prüfung auf Einheitlichkeit | 24 |
| 4. Eigenschaften | 27 |
| 4.1. Molekulargewicht | 27 |
| 4.2. pH-Optimum | 28 |
| 4.3. Aktivitätsminderung d.Entzug von $Mn^{++}$-Ionen | 29 |
| 4.4. Einfluß von Inhibitoren | 30 |
| 4.5. Stabilität | 31 |
| 4.6. Spezifität | 32 |
| 5. Diskussion | 38 |

Seite

B. Partielle Reinigung einer bis jetzt unbekannten Prolin-Peptidase 41

1. Reinigungsgang 41

2. Prüfung auf Einheitlichkeit 45

3. Eigenschaften 45
3.1. Molekulargewicht 45
3.2. pH-Optimum 46
3.3. Aktivitätsminderung d. Entzug von $Mn^{++}$-Ionen 46
3.4. Einfluß von Inhibitoren 47
3.5. Stabilität 47
3.6. Spezifität 48

4. Diskussion 52

EXPERIMENTELLER TEIL 54

Versuch-Nr.:

1. Messung der Prolinase-Aktivität 54
2. Messung der Prolidase-Aktivität 56
3. Messung der LAP-Aktivität 57
4. Proteinbestimmung 58
5. Gewinnung des Homogenates 60
6. Relative Verteilung der Enzymaktivitäten 61
7. Chromatographie an DEAE-Cellulose 61
8. Fraktionierte Äthanolfällung 63
9. Rechromatographie an DEAE-Cellulose 63
10. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung 64
11. Gelfiltration an Sephadex G-200 65
12. Chromatographie an QAE-Sephadex 67
13. Immunelektrophorese 68
14. Diskelektrophorese 71
15. Untersuchung der Spezifität 72

Seite

16. Glycinbestimmung 73
17. Messung der "neuen Prolin-Peptidasen"-Aktivität 74

ZUSAMMENFASSUNG 75

LITERATUR 78

Verwendete Abkürzungen:

| | |
|---|---|
| AS | Ammoniumsulfat |
| BNA | ß-Naphthylamid |
| CETAB | Cetyltrimethylammoniumbromid |
| DEAE - | Diäthylaminoäthyl- |
| E | Extinktion (d.h. Extinktionsdifferenz zu einem Blindwert) |
| g | Erdbeschleunigung |
| l | Liter |
| Leu-pNA | Leucin-p-nitranilid |
| M | Molarität (Mol/l) |
| mA | Milliampere |
| MG | Molekulargewicht |
| mU | $U \cdot 10^{-3}$ |
| nm | $10^{-6}$mm (mµ, Einheit der Wellenlänge) |
| p.A. | Reinheitsgrad von Reagentien |
| PCA | Pyrrolidoncarbonsäure |
| QAE - | Quartäres Ammonium-äthyl- |
| rpm | Umdrehungen/min |
| t | Zeit |
| TCA | Trichloressigsäure |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| % (w/v) | Konzentrationsangabe: g/100 ml |
| U | Einheit der Enzymaktivität (µ Mole gespaltenes Substrat/min). |
| V | Volt |
| $V_E$ | Elutionsvolumen einer Substanz bei säulenchromatographischer Trennung |
| VF | Verdünnungsfaktor |
| $V_o$ | Leervolumen einer Säule |
| Z- | Benzyloxycarbonyl- |

# E I N L E I T U N G

Prolinpeptide werden mit ausreichender Geschwindigkeit nur von spezifischen Enzymen gespalten. Kaum eine der bekannten Endo- und Exopeptidasen anderer Spezifität des Tier- oder Pflanzenreiches kann Peptidbindungen, an denen Prolin beteiligt ist, hydrolysieren, es sei denn extrem langsam; dies gilt auch und sogar in besonderem Maße für Bindungen des Hydroxyprolins.

"Prolinspezifische" proteolytische Enzyme interessieren beispielsweise im Zusammenhang mit dem Katabolismus des Kollagens. Dieses Faserprotein weist einen ungewöhnlich hohen Gehalt an Iminosäuren auf (12-13 Mol% Pro und 8-9 Mol% Hyp in Kalbshautkollagen; vgl. Graßmann et al., 1965). Allein ca. 40% der Sequenz des Kollagens bestehen aus Tripeptideinheiten des Typs Gly-Pro-X (X = verschiedene Aminosäurereste, besonders häufig Ala und Hyp). Diese Eigenschaften und die daraus resultierende, komplizierte Tripelhelix-Raumstruktur des Kollagenmoleküls bedingen einen Abbaumechanismus durch hochspezifische Enzyme, der im Prinzip jetzt bekannt ist (vgl. die Übersicht von Nordwig, 1971): Der Angriff auf das native Kollagen erfolgt in vivo durch spezifische Proteasen ("Kollagenasen"), die das stäbchenförmige Makromolekül in wenige, große Bruchstücke zerlegen. Diese sind thermisch erheblich labiler als das Makromolekül selbst, denatu-

rieren bei physiologischen Bedingungen und können deswegen auch von weniger spezifischen Enzymen des Intermediärstoffwechsels abgebaut werden. Spezifische proteolytische Enzyme spielen bei diesen stufenweise ablaufenden Vorgängen dann wieder eine Rolle, wenn die Kettenbruchstücke bis in die Nähe von Pro- bzw. Hyp-Bindungen verkürzt wurden.

Die bis jetzt bekannten prolinspezifischen Peptidasen des Säugers sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Sie wurden fast ausschließlich aus Niere, einem besonders peptidasenreichen Organ, isoliert. Im Mikrobenreich ist die sog. "Aminopeptidase P" (Yaron und Mlynar, 1968) von besonderem Interesse; ihre Spezifität ist ähnlich wie die der sog. "X-Prolyl-Aminopeptidase" (Dehm und Nordwig, 1970a). Letzterer kommt zusammen mit der "Carboxypeptidase P" (Dehm und Nordwig, 1970b) in der Endphase des Kollagenabbaus wohl eine besondere Bedeutung zu; beide Enzyme können Dipeptide, von der Struktur Pro-X bzw. X-Pro, erzeugen, für deren Hydrolyse Prolin-Dipeptidasen (Tab. 1) zur Verfügung stehen. Die vorliegende Arbeit wendet ihr Interesse der Spaltung von Prolinpeptiden auf dem Dipeptidniveau zu.

Tabelle 1: Prolin-spezifische Peptidasen des Säugers

| | Spez. Spaltung. | spez. Substrate | |
|---|---|---|---|
| Prolin-Iminopeptidasen | Pro ↓------ | Poly-Pro<br>Pro-BNA | Sarid et al., 1962;<br>Wakabayashi, 1964; |
| Aminotripeptidase | Pro ↓ $X_1$- $X_2$ | Pro-Gly-Gly | Kirschke et al., 1969; |
| Iminodipeptidase<br>(Prolinase; EC 3.4.3.5) | Pro ↓ X | Pro-Gly<br>Hyp-Gly | Graßmann et al., 1932;<br>Davis u. Smith, 1953; |
| X-Prolylaminopeptidase | X ↓ Pro -- | Gly-Pro-Hyp | Dehm u. Nordwig, 1970a; |
| Imidodipeptidase<br>(Prolidase; EC 3.4.3.7) | X ↓ Pro | Gly-Pro | Davis u. Smith, 1957; |
| Dipeptid-Naphthylamidase | X - Pro ↓------ | Gly-Pro-BNA | Hopsu-Havu et al., 1968; |
| Carboxypeptidase P | ----Pro ↓ X | Z-Pro-Ala | Dehm u. Nordwig, 1970b; |
| Lysosomale Carboxypeptidase (saures pH-Optimum) | ---- X ↓ Pro | Z- X -Pro | Fruton u. Bergmann, 1931; |

## A U F G A B E N S T E L L U N G

Die in Tab. 1 aufgeführte Iminodipeptidase (Prolinase) ist schon seit langem bekannt (Graßmann et al., 1932). Sie wurde aber auch in späteren Arbeiten (Neuman und Smith, 1951; Davis und Smith, 1953) als nur wenig gereinigtes Präparat untersucht; die beste bisher erzielte Anreicherung war etwa 30-fach. Dieser Umstand ließ einige Fragen offen: Zum Beispiel lassen sich eingehendere Angaben über die Spezifität eines Enzyms, besonders eines proteolytischen nur mit hochgereinigten Präparationen machen. Prolinase sollte zwar für die Hydrolyse von Dipeptiden wie Pro-Gly oder Hyp-Gly spezifisch sein (Tab. 1), das von Davis und Smith isolierte Enzym spaltet aber in hohem Maße auch Gly-Pro, ein typisches Substrat der Prolidase.

Um eine bessere Abgrenzung der Spezifitäten der Nieren-Dipeptidasen untereinander zu ermöglichen, war die Ausarbeitung eines verbesserten Reinigungsverfahrens für Prolinase mit modernen Methoden notwendig. Dabei sollte auch sorgfältig auf das eventuelle Vorkommen noch unbekannter, prolinspezifischer Peptidasen in Niere geachtet werden.

# E R G E B N I S S E

## A. Reinigung der Prolinase

### 1. Bestimmung der spezifischen Aktivität

#### 1.1 Enzymtest:

Testbedingungen:

Die Aktivitätsbestimmung für Prolinase wird bei pH 7,75, Substratsättigung, in Gegenwart von $Mn^{++}$ (1 m M) und bei einer Inkubationstemperatur von 40°C durchgeführt (vgl. Versuch 1). Substrat ist Pro-Gly. Es wurde nach Säurehydrolyse (6 N HCl, 110°C, 24 h) am Aminosäureanalysator auf Reinheit geprüft.

Zur quantitativen Messung der Enzymaktivität wird freigesetztes Prolin nach Messer (1961) bestimmt. Prolin ergibt mit Ninhydrin unter stark sauren Bedingungen bei Erhitzen ein rotes Reaktionsprodukt. Durch Zugabe von Glycin (1,8 µM/ml) steigt die Empfindlichkeit um etwa 50%, die Zeit des Erhitzens wird auf 30 min beschränkt, Störeffekte durch andere Aminosäuren oder Peptide werden weitgehendst ausgeschaltet. Peptidgebundenes Prolin ergibt unter diesen Bedingungen eine minimale Anfärbung;

diese Extinktion (Substratwert) wird von den Meßwerten subtrahiert. Das Absorptionsmaximum liegt bei 515 nm. Die Messungen innerhalb des linearen Bereichs bis E = 0,800 sind gut reproduzierbar.

Analog wird die Aktivität der Prolidase bestimmt (Substrat: Gly-Pro; $Mn^{++}$-Konzentration: 20 mM; vgl. Versuch 2); ebenso die Aktivität einer im Verlauf der vorliegenden Dissertation entdeckten, neuen Prolinpeptidase (Substrat: Pro-Leu$NH_2$; vgl. Abschnitt B und Versuch 17).

Die Aktivität der Leucinaminopeptidase (LAP) kann direkt bestimmt werden (Versuch 33). Das Spaltprodukt p-Nitranilin hat eine gelbliche Farbe. Es wird gegen den Substratblindwert bei E = 405 nm gemessen.

Die Enzymkinetiken entsprechen einer Reaktion 0. Ordnung.

Enzymeinheit (U) = 1 µMol freigesetztes Spaltprodukt/min (bei 40°C).

## 1.2. Proteinbestimmung

Es wird dabei die Methode nach Lowry et al. (1951) verwendet (Versuch 4). Die Nachweismethode beruht auf der Kombination von zwei Reaktionen: der Biuret-Reaktion, wobei die Peptidbindungen des Proteins in einer alkalischen $CuSO_4$-Lösung einen blauen Kupferkomplex ausbilden und der Reduktion eines Phosphorwolphramat-Phosphormolybdat-Gemisches (Phenolreagenz nach Folin) durch aromatische Aminosäuren, wie Tyrosin und Tryptophan, zu einem ebenfalls blauen Komplex. Die Extinktion bei 750 nm wird mit einem Rinder-Serumalbumin-Standard verglichen. Die Empfindlichkeit liegt zwischen 10 bis 200 µg. Die Meßgenauigkeit ist $\pm$ 10%.

Die spezifische Aktivität erhält man, wenn die Enzymeinheiten auf die vorhandene Proteinmenge bezogen werden (U/mg Protein).

## 2. Reinigungsgang

Als biologisches Ausgangsmaterial wurde schlachtfrischer Schweinenieren-Cortex verwendet. Einfrieren der Nieren vermindert die spezifische Ausgangsaktivität beträchtlich.

### 2.1. Homogenisieren

Durch Homogenisieren werden die Zellen zerstört und die Zellinhaltsstoffe in Freiheit gesetzt. Eine Veränderung der Zellorganellen, etwaiges Aufplatzen oder Verklumpen, wird durch iso- oder hypertonische Lösungen vermindert.

Hierzu wurde ein 20%iges Homogenat in einem isotonischen Saccharosepuffer hergestellt (Versuch 5).

Subzelluläre Verteilung: Eine grobe Fraktionierung der Enzymaktivitäten in einem löslichen und partikulären Anteil wurde durch hochtourige Zentrifugation erreicht (Versuch 6). Der lösliche Anteil entspricht etwa dem Cytoplasma, das Präzipitat enthält sämtliche Zellpartikel (Debris, Zellmembranen, Zellkerne, Mitochondrien, Mikrosomen, das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat). Nimmt man die jeweiligen Ausgangsaktivitäten im Homogenat zu 100% an, dann findet sich:

| | im Überstand | im Präzipitat |
|---|---|---|
| Prolinase-Aktiv. | ca. 87% | ca. 13% |
| Prolidase-Aktiv. | ca. 93% | ca. 7% |
| LAP-Aktivität | ca. 27% | ca. 73% |

Die Prolinase kommt also ähnlich wie die Prolidase überwiegend im Cytoplasma vor. Der größere Anteil der LAP-Aktivität ist im Präzipitat zu finden und kommt im wesentlichen der mikrosomalen Aminopeptidase M zu (Wachsmuth et al., 1966), die entsprechende Aktivität des Überstandes der löslichen Aminopeptidase (Himmelhoch u. Peterson, 1968). Diese Befunde stimmen mit den Angaben von Dehm und Nordwig (1970) sowie Kirschke und Hanson (1969) überein.

Dieses Verfahren, das für die Aufarbeitung größerer Volumina weniger geeignet ist, wurde bei der im folgenden beschriebenen Reinigung des Enzyms durch einen Fällungsschritt ersetzt. Die bei den Einzelschritten erzielten Reinigungserfolge und Ausbeuten sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

## 2.2. Fällung mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CETAB)

Eine grobe Fraktionierung von Homogenaten kann z.B. durch Fällung mit Detergentien erreicht werden. Dies beruht darauf, daß die zur Fällung

verwendeten Verbindungen, hydrophobe, grenzflächenaktive und zugleich hydrophile Gruppen enthalten. CETAB gehört zu den kationaktiven Verbindungen.

Bei tropfenweiser Zugabe einer 10%-igen CETAB-Lösung zum Homogenat kam es zur Verklumpung der Zellpartikel, die bei etwa 9000 g abzentrifugiert werden konnten. Etwaige Fettreste im Überstand wurden durch vorsichtiges Abnutschen über Hyflo-Super-Cel entfernt (Versuch 5). Dieser Fällungsschritt erlaubte ein rasches Aufarbeiten von 4000 ml Rohhomogenat.

Es wurden so etwa 70% der Prolinase-Aktivität in 2-3-facher Anreicherung gewonnen.

## 2.3. Reinigung an DEAE-Cellulose

Durch verschiedene Fällungsmethoden (mit Säure, Ammoniumsulfat, Äthanol, Aceton oder Polyäthylenglycol 6000) konnte in diesem Stadium eine befriedigende Anreicherung der Prolinase-Aktivität bei angemessener Ausbeute nicht erzielt werden. DEAE-Cellulose-Chromatographie in Anlehnung an Himmelhoch und Peterson (1968) führte dagegen zum Erfolg.

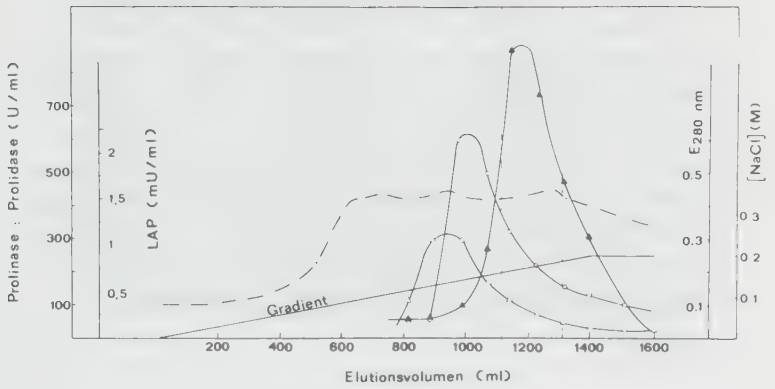



Abb. 1: Reinigung der Prolinase an DEAE-Cellulose

-.-.- Protein
-▲-▲- Prolinase-Aktivität
-△-△- Prolidase-Aktivität
-o-o- LAP-Aktivität

(Die gesammelten Fraktionen sind durch Strichelung angedeutet.)

Auf eine Säule (Bettvolumen 18·6 cm) wurde der noch rotgefärbte CETAB-Überstand (insgesamt 34g Protein) aufgetragen. Durch Nachwaschen mit Puffer wurde das nicht gebundene Protein herausgespült. Das adsorbierte Enzym wurde mit einem linearen Salzgradienten eluiert (Versuch 7, Abb. 1).

Ein Großteil der störenden Prolidase, die zuerst eluiert wird, konnte dabei von der Proli-

nase abgetrennt werden. Dagegen überlappt der LAP-Peak, der zwischen beiden Enzymen liegt, beträchtlich den der Prolinase. Die LAP wird deswegen in diesem Schritt beträchtlich, nämlich etwa 10-fach, angereichert. Der Anstieg der spezifischen Aktivität der Prolinase ist etwa 12-fach. Die Aktivitätsausbeute beträgt dabei etwa 30%. Der hohe Aktivitätsverlust ist aber nicht nur auf das enge Fraktionieren, sondern auch auf die Labilität des Enzyms zurückzuführen (vgl. Abs. 4.5.).

## 2.4. Fraktionierte Fällung mit Äthanol

Durch organische Lösungsmittel wird die Elektrolyt-Konzentration des Lösungsmittels vermindert. Proteine lassen sich so fraktioniert fällen. Eine Inaktivierung von Enzymen wird durch Arbeiten bei niederen Temperaturen vermindert.

Die günstigsten Ergebnisse konnten mit Äthanolfraktionierung erzielt werden (Versuch 8). In der Fraktion, die bei Zugabe von 35-55 Vol.% Alkohol ausfällt, ist die Anreicherung der Prolinase-Aktivität etwa 2-fach bei 50-60%iger Aktivitätsausbeute. Auch in diesem Schritt verhält sich die LAP sehr ähnlich wie die Prolinase. Prolidase-Aktivität läßt sich dagegen gut abtrennen.

## 2.5. Rechromatographie an DEAE-Cellulose

Es lag nahe, im Anschluß an die erfolgreich verlaufene Chromatographie an DEAE-Cellulose nun mit dem weitergereinigten Material an einer kleineren Säule (2,5·10 cm) eine Rechromatographie vorzunehmen. Die in diesem Stadium vorliegende Proteinmenge (300 mg) ist besser für eine Feinfraktionierung geeignet.

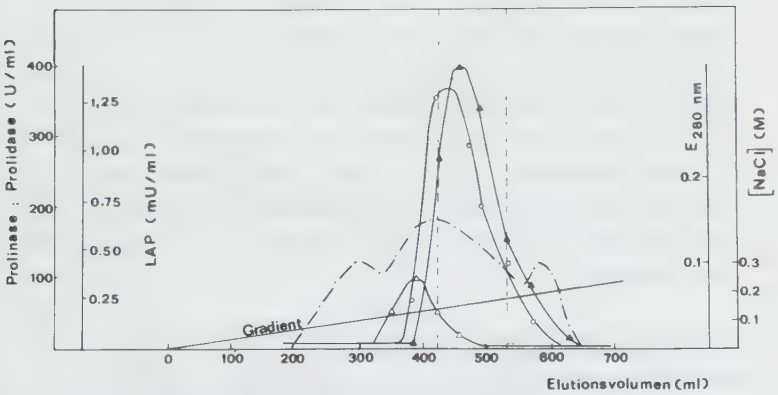



Abb. 2: Reinigung der Prolinase durch Rechromatographie an DEAE-Cellulose

-.-.- Protein
-▲-▲- Prolinase-Aktivität
-Δ-Δ- Prolidase-Aktivität
-o-o- LAP-Aktivität

Der im letzten Schritt gewonnene Überstand wurde auf die DEAE-Säule gepumpt. Nach Waschen mit Puffer wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert (Versuch 9, Abb. 2).

Die Prolidase läßt sich bei diesem Vorgehen weiter entfernen, LAP und Prolinase chromatographieren annähernd gleich. Die Anreicherung der Prolinase in diesem Schritt ist etwa 1,5-2-fach bei einer Aktivitätsausbeute von etwa 60%.

## 2.6 Fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat

Ein weiterer Fällungsschritt sollte neben einer Anreicherung der Prolinase eine Konzentrierung der Proteinlösung auf ein geringes Volumen erbringen. Durch Erhöhung der Salzkonzentration, z.B. mittels Ammoniumsulfat, lassen sich Proteine ausfällen.

In der Fraktion, die zwischen 50- und 80%iger Sättigung mit Ammoniumsulfat anfällt (Versuch 10), wird die Prolinase 2-3-fach angereichert. Die spezifische Aktivität von Prolidase bleibt unverändert, die der LAP sinkt dagegen stark ab. Die Fraktionierung mit Ammoniumsulfat in diesem Reinheitsstadium der Prolinase ist von ausschlaggebender Bedeutung für die schwierige Abtrennung der LAP.

## 2.7. Gelfiltration an Sephadex G-200

Die Volumenkonzentrierung im vorhergehenden Schritt erlaubt nun eine Fraktionierung nach Molekülgröße mittels Gelfiltration.

Für die weitere Reinigung wird das in Puffer gelöste Ammoniumsulfat-Präzipitat an einer Sephadex G-200-Säule mit einem Bettvolumen 1,5· 115 cm chromatographiert (Versuch 11a, Abb. 3).

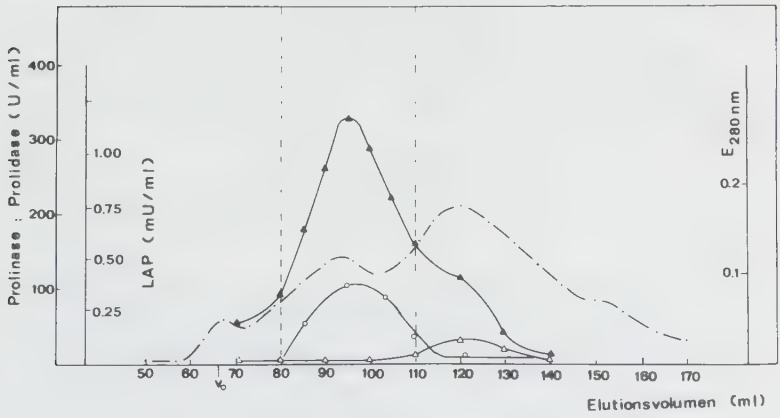



Abb. 3: Reinigung der Prolinase durch Gelfiltration an Sephadex G-200

-•-•- Protein
-▲-▲- Prolinase-Aktivität
-△-△- Prolidase-Aktivität
-○-○- LAP-Aktivität

Der Hauptpeak der Prolinase chromatographiert wie die LAP. Die Prolinase wird etwa 2-fach angereichert, die Gesamtanreicherung ist also etwa 300-fach. Das gewonnene Präparat ist praktisch frei von Prolidase-Aktivität, enthält aber immer noch verhältnismäßig viel LAP.

## 2.8. Chromatographie an QAE-Sephadex

Eine weitere Auftrennung der Prolinase und der LAP sollte unter Ausnutzung ihrer geringen Ladungsunterschiede (vgl. Abb. 1) versucht werden. Dazu wurde QAE-Sephadex, ein durch eine quartäre Ammoniumgruppe stark basischer Anionenaustauscher, verwendet (vgl. Versuch 12, Abb. 4).

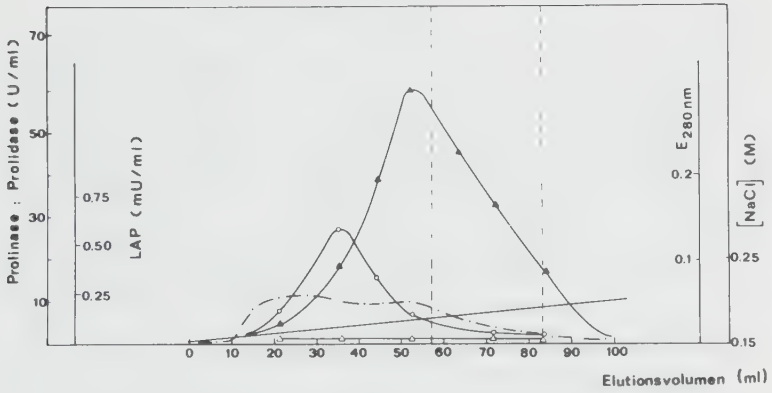



Abb. 4: Reinigung der Prolinase an QAE-Sephadex

-.-.- Protein
-▲-▲- Prolinase-Aktivität
-Δ-Δ- Prolidase-Aktivität
-o-o- LAP-Aktivität

Aber auch bei diesem, an sich sehr wirkungsvollen Reinigungsschritt konnte die Prolinase nicht vollständig von der LAP getrennt werden. Da die rechte Peakhälfte der Prolinase-Aktivität nahezu frei von LAP ist, wurde nur sie verwendet. Die Aktivitätsausbeute beträgt dabei etwa 45%. Die Prolinase wird in diesem Schritt nochmals etwa 1,5-fach angereichert.

## 2.9. Zusammenfassung der Reinigungsergebnisse

Die Prolinase wurde in den acht beschriebenen Reinigungsschritten etwa 450fach angereichert. Die Gesamtaktivitätsausbeute beträgt dabei nur etwa 1%. Dies ist bedingt durch die Labilität des Enzyms und durch das enge Fraktionieren, das notwendig ist, um zwei sehr ähnliche Enzyme, die Prolidase und die LAP, zu entfernen. Die Prolidase kann im Verlauf der Reinigung praktisch vollkommen abgetrennt werden, die in sehr geringen Mengen noch vorhandene LAP ist etwa 5-fach gegenüber dem Homogenat angereichert. Ein Vergleich der Spaltungsraten der drei Enzyme bestätigt, daß nur noch Spuren dieser beiden Begleitpeptidasen im Prolinase-Präparat vorhanden sind (vgl. Tab. 5).

Der Reinigungsgang wurde in 5 Tagen durchgeführt.

In Tabelle 2 ist eine quantitative Auswertung eines charakteristischen Reinigungsganges wiedergegeben. Tabelle 3 zeigt das Verhalten der Prolidase- und LAP-Aktivitäten bei den einzelnen Reinigungsprozessen.

Tabelle 2:
Reinigungsgang für die Prolinase

| Fraktion | Volumen (ml) | Gesamtprotein (mg) | Aktivitätsausbeute (%) | Spez. Aktivität (U/mg Protein) | Anreicherungsfaktor |
|---|---|---|---|---|---|
| Homogenat | 4 000 | 116 000 | ( 100 ) | 4 | ( 1 ) |
| Überstand der CETAB-Fällung | 3 400 | 34 000 | 73 | 10 | 2,5 |
| Chromatographie an DEAE-Cellulose | 184 | 960 | 23 | 108 | 27 |
| Äthanolfällung (35-55 Vol%) | 60 | 300 | 13 | 200 | 50 |
| Rechromatographie an DEAE-Cellulose | 107 | 107 | 7,3 | 320 | 80 |
| Fällung mit Ammoniumsulfat (50-80% Sättg.) | 2,2 | 30,8 | 4,7 | 720 | 180 |
| Gelfiltration an Sephadex G-200 | 30 | 9 | 2,3 | 1 200 | 300 |
| Chromatographie an QAE-Sephadex | 30 | 2,8 | 1 | 1 800 | 450 |

Tabelle 3:

Reinigung der Prolinase: Verhalten zweier Fremdenzyme bei den einzelnen Schritten

| Fraktion | Prolidase + | | Leucin-Aminopeptidase ++ | |
|---|---|---|---|---|
| | Spez.Aktivität (U/mg Protein) | Anreicherungsfaktor | Spez.Aktivität (U/mg Protein) | Anreicherungsfaktor |
| Homogenat | 3,6 | 1 | 0,041 | 1 |
| Überstand der CETAB-Fällung | 11,0 | 3 | 0,041 | 1 |
| Chromatographie an DEAE-Cellulose | 7,6 | 2 | 0,41 | 10 |
| Äthanolfällung (35-55 Vol%) | 3,6 | 1 | 0,81 | 20 |
| Rechromatographie an DEAE-Cellulose | 6,4 | 1,7 | 1,70 | 42 |
| Fällung mit Ammoniumsulfat (50 - 80% Sättg.) | 5,5 | 1,5 | 0,41 | 10 |
| Gelfiltration an Sephadex G-200 | 3,6 | 1 | 3,25 | 80 |
| Chromatographie an QAE-Sephadex | 3,3 | 0,9 | 0,2 | 5 |

+ Akt. Ausb. = $2,2 \cdot 10^{-3}$% ++ Akt.Ausb. = $1,2 \cdot 10^{-2}$%

## 3. Prüfung auf Einheitlichkeit

Bei der Immunelektrophorese werden zuerst die Antigene elektrophoretisch auf einer Agrarplatte aufgetrennt; dann wird Antiserum aufgetragen. Nach Diffusion von Antigen und Antikörper bilden sich sehr spezifische Immunkomplexe, die bei optimalen Konzentrationsverhältnissen ausfallen und als Präzipitatslinien sichtbar werden.

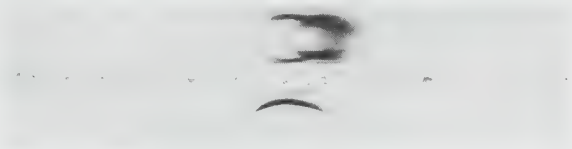



Abb. 5: Immunelektrophoretische Analyse des reinsten Prolinase-Präparates

I "DEAE-Eluat"
II reinste Prolinase

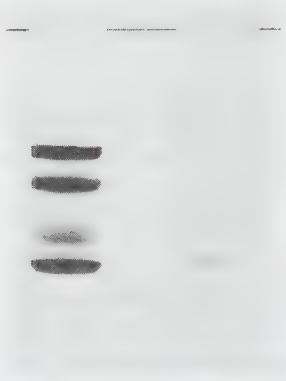
Zur Herstellung des Antiserums mit "DEAE-Eluat" (= an DEAE-Cellulose gereinigte Prolinase mit dem Reinheitsfaktor von etwa 25, vgl. Kap. 2.3.) und zur Durchführung vgl. Versuch 13. Als Antigen diente das reinste Prolinase-Präparat.

Nach Abb. 5 tritt bei dem reinsten Prolinase-Präparat ein Hauptpräzipitatsbogen auf, daneben ist aber noch ein zweiter Bogen mit derselben elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit

sichtbar. Das Präparat ist also immunologisch nicht einheitlich.

Bei der Diskelektrophorese beruht die hervorragende Trennfähigkeit von Proteinen auf dem Zusammenwirken von drei Faktoren:

a. Konzentrierung des Trenngemisches vor dem Eindringen in das Gel mit Hilfe eines diskontinuierlichen Puffersystems.
b. Trennung nach elektrophoretischer Beweglichkeit.
c. Molekularsiebeffekt; d.h. zusätzliche Trennung nach Molekülgröße.



I II

Abb. 6: Diskelektrophoretische Analyse des reinsten Prolinase-Präparates

I reinstes Prolinase-Präparat
II reduzierte Probe

Die Diskelektrophorese des reinsten Prolinasepräparates (Versuch 14) zeigt mehrere Banden, vier davon sind dominant (Abb. 6). Allen vier Hauptbanden konnte Prolinase-Aktivität zugeordnet werden (Zerschneiden eines Vergleichgels sofort nach Elektrophorese in Scheibchen von 0,3 cm und Elution in Puffer).

Nach Reduktion des Prolinasepräparates mittels Dialyse gegen 1%iges 2-Mercaptoäthanol über Nacht bei 7°C wird in der Diskelektrophorese praktisch nur eine einzige Bande gefunden (vgl. Abb. 6). Im Original ist noch zusätzlich eine leichte Verunreinigung zu erkennen.

Auf diese Befunde wird in der Diskussion näher eingegangen.

## 4. Eigenschaften

### 4.1. Molekulargewicht

Das Molekulargewicht von Proteinen läßt sich mit hinreichender Genauigkeit mittels Gelfiltration bestimmen; denn es besteht eine lineare Beziehung zwischen Elutionsvolumen $V_E$ und dem Logarithmus des Molekulargewichtes (lg MG). Bei der graphischen Darstellung bevorzugt man die standartisierte Beziehung $V_E/V_O$ ($V_O$= Leervol.)

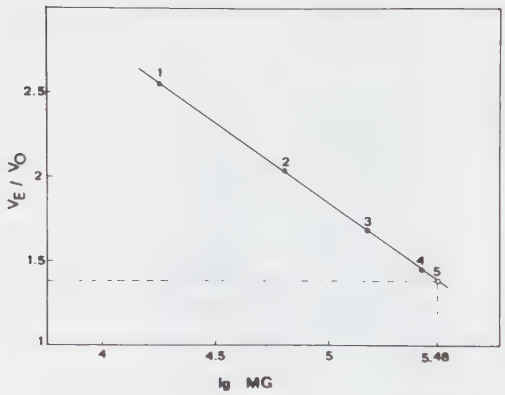



Abb. 7: Bestimmung des Molekulargewichtes der Prolinase an Sephadex G-200

1. Myoglobin
2. Rinder-Serumalb.
3. $\gamma$ -Globulin
4. Katalase
5. Prolinase

Für die Prolinase ergab sich ein MG von etwa 300 000 (Versuch 11b). Eine Heterogenität des Präparates, auf die das Ergebnis der Disk-Elektrophorese (s. Abb. 6) schließen lassen könnte, wurde bei diesem Versuch nicht gefunden.

Dieses MG ist recht hoch, entspricht jedoch dem anderer Nierenenzyme. Beispielsweise hat die LAP (Himmelhoch und Peterson, 1968) ebenfalls ein MG von 300 000; die Aminopeptidase M (Wachsmuth et al., 1966) hat ein MG von 280 000, die Carboxypeptidase P (Dehm und Nordwig, 1970 b) ein MG von 240 000.

## 4.2. pH-Optimum

Die Abhängigkeit der Aktivität vom pH des Mediums muß in Puffer ohne $Mn^{++}$-Ionen bestimmt werden, da ausschließlich im alkalischen pH-Bereich gemessen wird. Die Enzymprobe wird dafür gegen manganionen-freien Puffer über Nacht im Kühlraum dialysiert.

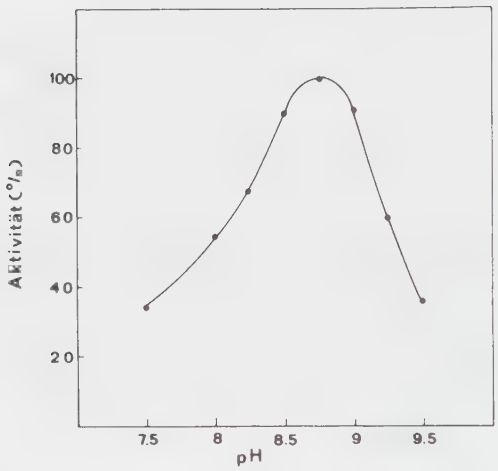



Abb. 8: Abhängigkeit der Prolinase-Aktivität vom pH des Mediums

Das pH-Optimum liegt um 8,75; dieser Befund stimmt mit Literaturangaben überein (Davis und Smith, 1953).

## 4.3. Aktivitätsminderung durch Entzug von $Mn^{++}$-Ionen

Der Abfall der Aktivität um etwa 60%, der bei Dialyse der Prolinase gegen manganionen-freien Puffer beobachtet wird, deutet eine $Mn^{++}$-Ionen-Abhängigkeit der Prolinase an. Dieser Effekt

wurde wegen der Labilität des Enzyms nicht näher untersucht.

Die starke Aktivierung durch $Mn^{++}$-Ionen ist eine Eigenschaft, die auch für andere Prolinpeptidasen der Niere gilt: für Prolidase, X-Prolyl-Aminopeptidase, Carboxypeptidase P und Proliniminopeptidase.

## 4.4. Einfluß von Inhibitoren

Blockierung der Aktivität durch spezifische Inhibitoren läßt einen gewissen Schluß auf die Natur des aktiven Zentrums zu. Spezifisch mit Serinresten reagieren Diisopropylfluoro-phosphat (DFP) und Phenylmethylsulfonyl-fluorid (PMSF). p-Chloromercuribenzoat (PCMB) ist ein spezifisches Sulfhydryl-Reagenz.

Zum reinsten Prolinase-Präparat wurden die Inhibitoren so dazugegeben, daß im Test eine Konzentration von 2,5 mM vorliegt. PCMB ist erst bei pH 9 löslich.

| | Konz. | pH | Restaktivität |
|---|---|---|---|
| DFP | 2,5 mM | 7,75 | 43% |
| PMSF | 2,5 mM | 7,75 | 43% |
| PCMB | 2,5 mM | 9 | 100% |

PCMB hemmt Prolinase nicht; ein Cysteinrest im aktiven Zentrum dürfte also auszuschließen sein. Versuche zur Aktivierung unreinerer Prolinase-Präparate mit Glutathion (1 mM) waren ebenfalls erfolglos, was dieses Ergebnis unterstützen würde. Prolidase wird dagegen bei der angewendeten PCMB-Konzentration vollkommen inhibiert (Davis u. Smith, 1957).

DFP und PMSF zeigen in verhältnismäßig hoher Konzentration eine Inhibition von etwa 50%, was auf die Beteiligung eines Serinrestes im aktiven Zentrum hindeuten könnte.

## 4.5. Stabilität

Die Prolinase verliert bei + 4°C nach etwa 10 Tagen 50% der Aktivität. Durch Einfrieren wird das Enzym praktisch inaktiviert (vgl. Kap. A.2)

Bei 40°C fällt die Aktivität schon nach 60 min um etwa 50% (Abb. 9).

Im Gegensatz zur Prolidase, die bei ähnlichen Bedingungen eine signifikante Aktivierung erfährt (Davis und Smith, 1953), ist also die Prolinase ein sehr labiles Enzym.

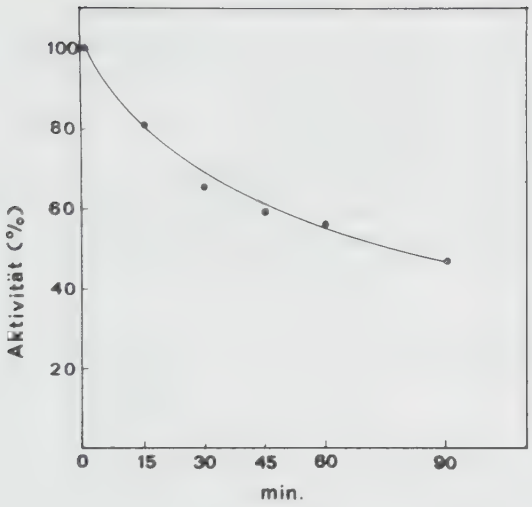



Abb. 9: Untersuchung der Stabilität von Prolinase bei 40°C.

## 4.6. Spezifität

Bei der Untersuchung der Substratspezifität war auf Grund von älteren Ergebnissen die Spaltbarkeit von prolinhaltigen Dipeptiden von besonderem Interesse (Tab. 4). Zur Abgrenzung gegenüber der Spezifität anderer Nierenpeptidasen wurden auch deren Substrate geprüft (Tab. 5).

Zur Durchführung s. Versuch 15. Es wurde dabei streng auf vergleichbare Bedingungen geachtet; notwendige Ausnahmen hiervon sind in Tab. 4 u. 5 eigens erwähnt.

Als Beispiel für die Brauchbarkeit der gewählten Versuchsbedingungen ist in Abb. 10 die Kinetik der Spaltung von Pro-Gly gezeigt.

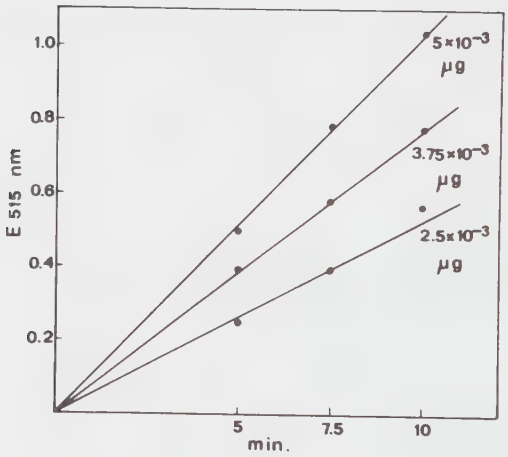



Abb. 10: Spaltung von Pro-Gly durch Prolinase: Zeitlicher Verlauf der Reaktion in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.

Tabelle 4:
Substratspezifität der Prolinase

| Substrate | rel.Spaltungs-geschwindgk. (Spaltg.Pro-Gly=100) | Meßmethode (s.Vers.15) |
|---|---|---|
| Pro - Gly | 100 | a |
| Pro - Ala | 100 | a |
| Pro - Met | 100 | a |
| Pro - Lys | 129 | a |
| Pro - Glu | 58 | a |
| Pro - Leu (+) | 4 | a |
| Pro - Phe (+) | 6,8 | a |
| Pro - Try (+) | 2,3 | a |
| Pro - Hyp | 1,4 | a |
| Pro - Pro | 0,7 | a |
| Hyp - Gly | 30 | e |
| Sar - Gly | 0,1 | d |
| Leu - Gly | 19 | d |
| Gly - Gly | 18 | d |
| Z - Pro - Gly | 0 | d |
| Pro - Gly - Phe | 0,3 | a |
| Pro - $GlyNH_2$ | 0,4 | a |
| Pro - $LeuNH_2$ | 30 | a |

(+) Substrat in Methanol gelöst

Tabelle 5:

Spezifität der Prolinase:
Prüfung auf Verunreinigung durch andere bekannte Nierenpeptidasen (vgl. Tab. 1).

| Substrate | rel.Spaltungs-geschwindigk. (Spaltung Pro-Gly = 100) | Meßmethode (s.Vers.15) |
|---|---|---|
| Poly - Pro | 0,5 | a |
| Pro - BNA (+) | 0 | a |
| Pro - Gly - Gly | 0,3 | a |
| Gly - Pro - Hyp | 0 | d |
| Gly - Pro | 0,3 | b |
| Gly - Gly - Gly | 0 | d |
| Gly - Leu - Tyr | 0,4 | d |
| Leu - pNA (+) | 0,3 | c |

(+) Substrat in Methanol gelöst

Bei Dipeptiden vom Typ Pro-X interessierte die Spaltungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Natur der Aminosäure X.

Ist der Rest unpolar und unverzweigt, so werden die Peptide sehr gut und mit gleicher Geschwindigkeit gespalten. Ein basischer Rest (Lys) in Position X erhöht, eine Säurekette (Glu) vermindert die Spaltungsrate beträchtlich. Ist X ausgeprägt lipophil und raumerfüllend (Leu, Phe, Try), so ist die Hydrolyse stark herabgesetzt. Ein Dipeptid aus zwei Iminosäuren (X = Pro, Hyp) wird noch langsamer gespalten; inwieweit das Substrat der enzymatischen Hydrolyse durch Diketopiperazinbildung in diesem Fall besonders rasch entzogen wird, wurde nicht untersucht.

Auch Dipeptide vom Typ X-Gly wurden untersucht.

Hyp-Gly wird verhältnismäßig rasch gespalten, jedoch beträgt die Spaltungsgeschwindigkeit nur 30% von der des entsprechenden Pro-Peptids. Steht für X=Sar, so wird das Testpeptid kaum angegriffen; ist X=Leu oder Gly, ist die Spaltung erheblicher.

Ferner wurde der Einfluß der freien $NH_2$- bzw. COOH-Gruppe der Dipeptide auf deren Hydrolyse mit geeigneten Substraten untersucht.

Ist die $NH_2$-Gruppe von Pro-Gly durch Z geschützt, wird das Peptid total unspaltbar. Bei Blockie-

rung der freien COOH-Gruppe durch eine Amidbindung (Pro-Gly$NH_2$) oder eine andere Aminosäure (Pro-Gly-Phe; s.a. Pro-Gly-Gly, Tab. 5) tritt praktisch keine Spaltung auf.

Die Prolinase ist also eine Dipeptidase.

In einer weiteren Untersuchungsreihe wurde das reinste Prolinase-Präparat auch auf Verunreinigung durch andere bekannte Nierenpeptidasen geprüft (s. Tab. 5).

Demnach sind Proliniminopeptidasen (Poly-Pro, Pro-BNA), Aminotripeptidase (Pro-Gly-Gly), X-Prolyl-Aminopeptidase (Gly-Pro-Hyp), Prolidase (Gly-Pro), Triglycinase (Gly-Gly-Gly; Hanson et al., 1959) und LAP (Leu-pNA, Gly-Leu-Tyr) höchstens in Spuren vorhanden.

Auffallend ist jedoch die beträchtliche Spaltung von Pro-Leu$NH_2$. Eine genauere Untersuchung im zweiten Teil der Arbeit weist es als Substrat einer bisher unbekannten Enzymaktivität aus.

## 5. Diskussion

Die Iminodipeptidase (Prolinase) konnte erstmals als hochgereinigtes Präparat isoliert werden. Es ist im wesentlichen frei von Fremdaktivitäten.

Eine genauere Untersuchung der molekularen Eigenschaften, besonders der Einheitlichkeit, war im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wegen der geringen Proteinausbeute bei der Reinigung nicht mehr möglich.

Das Ergebnis der immunelektrophoretischen Untersuchung zeigt, daß noch eine verunreinigende Komponente vorliegt (Abb. 5). Dabei dürfte es sich um das bereits erwähnte Enzym handeln, das Pro-Leu$NH_2$ spaltet. Es kann mit dem angegebenen Verfahren, wie im zweiten Teil der Arbeit gezeigt wird (vgl. Abb. 11), nur teilweise von der Prolinase getrennt werden.

Das Ergebnis der Diskelektrophorese (Abb. 6) kann also nicht als Ausdruck einer Verunreinigung durch mehrere Fremdkomponenten verstanden werden. Man kann es so deuten, daß die Prolinase aus mehreren Untereinheiten besteht; in diesen Zusammenhang paßt die ausgeprägte Labilität, die auf einem Dissoziationsprozeß beruhen könnte. Vorversuche für die durch Reduktion erhaltene, nahezu einheitliche Komponente ergaben ein MG von etwa 50 000 (SDS-Diskelektrophorese nach Shapiro et al., 1967). Die in der Diskelektrophorese gefundenen Banden könnten also teilweise

dissoziierter Prolinase oder reaggregierten Prolinase-Untereinheiten zugeordnet werden. In einem wie im anderen Fall darf man enzymatisch aktive Komponenten erwarten, was dem experimentellen Befund entspricht. Auch bei anderen Nierenpeptidasen wurden Untereinheiten diskutiert bzw. nachgewiesen. Für Prolidase fanden Davis u. Smith (1957) aktive Präparate von verschiedenem Molekulargewicht. LAP-Präparate bestehen ebenfalls aus mehreren Komponenten (Himmelhoch u. Peterson, 1968) und die Existenz von Untereinheiten bei diesem Enzym wurde inzwischen von Melius et al.(1970) eindeutig nachgewiesen.

Das Ergebnis der Spezifitätsuntersuchungen zeigt die Spaltung nicht prolinhaltiger Dipeptide (Leu-Gly, Gly-Gly) durch Prolinase. Das erinnert an Befunde mit hochgereinigter Leucylglycinase (Binkley et al., 1968), die ihrerseits auch Pro-Gly spaltet. Auch Carboxypeptidase P akzeptiert Ala und Gly an der für die Hydrolyse entscheidenden Position (Dehm, 1969; Dehm u. Nordwig, 1970b), wobei die relative Spaltungsrate stark abfällt. Bis zu einem gewissen Grad scheint Prolin durch andere Aminosäuren ersetzbar zu sein. Eine Verunreinigung des Prolinase-Präparates mit einer Dipeptidase anderer Spezifität kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Auffallend ist die relativ langsame Spaltbarkeit von Hyp-Gly durch Prolinase. Frühere Ergebnisse, die gezeigt haben, daß Hyp-Gly von der Prolinase wesentlich rascher als Pro-Gly hydrolysiert wird,

(Davis u. Smith, 1953) sind also zu korrigieren. Ein ähnlich differenziertes Verhalten gegenüber Hydroxyprolinbindungen zeigen auch andere prolinspezifische Peptidasen, z.B. Prolidase (Davis u. Smith, 1957), Prolin-Iminopeptidase (Sarid et al., 1962), X-Prolylaminopeptidase (Dehm u. Nordwig, 1970a), auch Carboxypeptidase C, ein pflanzliches Enzym (Nordwig, 1968).

## B. Partielle Reinigung einer bis jetzt unbekannten Prolin-Peptidase*

Die auffallend rasche Spaltung des Peptidamids Pro-Leu$NH_2$ durch das reinste Prolinase-Präparat war Anlaß für eine weitere Untersuchungsreihe. Der Effekt konnte nämlich sicher nicht mit Prolinase zusammenhängen (vgl. Tab. 4: sehr geringe Hydrolyse von Pro-Gly$NH_2$ durch Prolinase), ebenso nicht mit Aminotripeptidase (vgl. Tab. 4 und 5: geringe Spaltung von Pro-Gly-Gly und Pro-Gly-Phe) und Proliniminopeptidasen (langsame Spaltung von Poly-pro und Pro-BNA). Um zu einer klaren Aussage zu kommen, wurde versucht, das Enzym mit der hohen Affinität zu Pro-Leu$NH_2$, aus Nierenhomogenat wenigstens partiell zu reinigen.

### 1. Reinigungsgang

Da die "neue Prolin-Peptidase" ("NPP") offenbar starke Ähnlichkeit mit Prolinase hat und sich von ihr auch in dem geschilderten Mehrstufenprozeß nicht oder nur unvollkommen trennen läßt (vgl. Tab. 4), erschien es aussichtsreich auch

---

* Dieses Enzym konnte im Verlaufe der vorliegenden Untersuchung nicht in einheitlicher Form gewonnen werden; seine Spezifität läßt sich also nur unvollkommen beschreiben. Es wird deswegen vorläufig als "neue Prolin-Peptidase" ("NPP") bezeichnet.

für dieses Enzym im Prinzip das Prolinase-Reinigungsschema zu übernehmen. Zur Aktivitätsbestimmung vgl. Kap. A. 1.1 und Vers. 17.

Subzelluläre Verteilung: Nimmt man die Ausgangsaktivität im Homogenat zu 100% an, findet sich nach Zentrifugation (100 000 g/90 min; s. Vers. 6):

| | im Überstand | im Präzipitat |
|---|---|---|
| "NPP"-Aktivität | ca. 83% | ca. 17% |

Die Aktivität ist, ähnlich wie bei der Prolinase, überwiegend im löslichen Anteil.

Bei den einzelnen Reinigungsschritten verhält sich die "neue Prolin-Peptidase" weitgehend ähnlich wie die LAP. In ihren Fällungseigenschaften (Äthanol- und Ammoniumsulfat-Fraktionierung) unterscheidet sie sich jedoch deutlich von diesem Enzym (vgl. Tab. 3 und 6). Bei diesen Schritten gelingt im wesentlichen die Trennung der beiden, in ihren physikalischen Eigenschaften sonst sehr ähnlichen Enzyme.

Eine Abtrennung der Prolinase gelingt aber auch an QAE-Sephadex nur teilweise, obwohl eine für die "NPP" günstigere Fraktionierung gewählt wurde (Abb. 11). Trotz Verarmung an spezifischer Aktivität ist dieser Reinigungsschritt aber nö-

tig, weil bei diesem Verfahren besonders deutlich wird, daß kein Zusammenhang zwischen der Pro-$LeuNH_2$-spaltenden Peptidase und Prolinase bestehen kann. Die entsprechende Aktivität geht also sicher auf eine "neue Prolin-Peptidase" zurück.

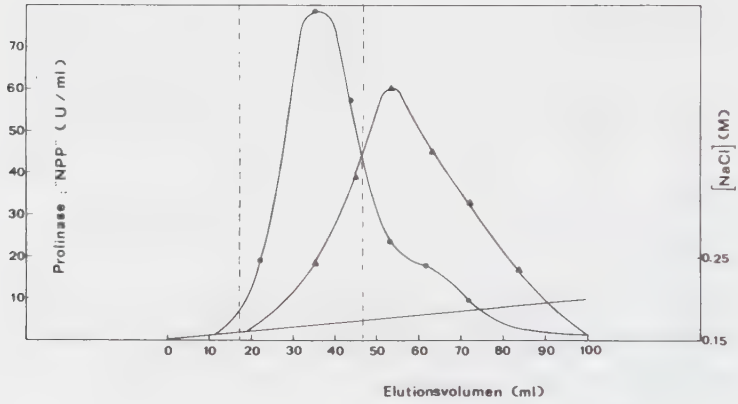



Abb. 11: Verlauf der Aktivität der "neuen Prolin-Peptidase" und der Prolinase an QAE-Sephadex

-.-.- "neue Prolin-Peptidase"
-▲-▲- Prolinase

Durch das in Tab. 6 zusammengefaßte Reinigungsverfahren wird die "neue Prolin-Peptidase" etwa 200-fach angereichert. Die Aktivitätsausbeute ist gering, sie liegt bei etwa 1%. Die Proteinausbeute beträgt dabei etwa 3,5 mg.

Tab. 6 zeigt das Ergebnis eines charakteristischen Reinigungsganges:

Tabelle 6:
Reinigungsgang der "neuen Prolin-Peptidase"

| Fraktion | Volumen (ml) | Gesamtprotein (mg) | Aktivitätsausbeute (%) | Spez. Aktivität (U/mg Protein) | Anreicherungsfaktor |
|---|---|---|---|---|---|
| Homogenat | 4 000 | 116 000 | (100) | 3,9 | (1) |
| Überstand der CETAB-Fällung | 3 400 | 34 000 | 60 | 7,8 | 2 |
| Chromatographie an DEAE-Cellulose | 184 | 960 | 17 | 78 | 20 |
| Äthanolfällung (35-55 Vol%) | 60 | 300 | 15 | 234 | 60 |
| Rechromatographie an DEAE-Cellulose | 107 | 107 | 11 | 468 | 120 |
| Fällung mit Ammoniumsulfat (50-80% Sättg.) | 2,2 | 30,8 | 4 | 625 | 160 |
| Gelfiltration an Sephadex G-200 | 30 | 9 | 2 | 1 090 | 280 |
| Chromatographie an QAE-Sephadex | 30 | 3,5 | 0,6 | 780 | 200 |

2. Prüfung auf Einheitlichkeit

Eine einheitliche Proteinkomponente war angesichts des für Säugerenzyme verhältnismäßig niedrigen Reinheitsfaktors nicht zu erwarten. Tatsächlich wurden in der Immunelektrophorese des reinsten Präparates drei Präzipitatsbögen gefunden (Abb. 12).

I "DEAE-Eluat"
II reinste "NPP"

Abb. 12: Immunelektrophoretische Analyse des reinsten Präparates der "neuen Prolin-Peptidase"

Auf Grund dieses Befundes wurden keine weiteren Untersuchungen vorgenommen.

3. Eigenschaften

3.1. Molekulargewicht

Die Bestimmung des Molekulargewichtes wurde an Sephadex G-200 vorgenommen (s. Vers. 11b). Es wurde dabei für die "neue Prolin-Peptidase" ein MG von 300 000 ermittelt.

## 3.2. pH-Optimum

Bei der Ermittlung des pH-Optimums wurde in manganionen-freiem Puffer gemessen. Dafür wurde die Enzymprobe gegen manganionen-freien Puffer über Nacht bei 7°C dialysiert. Das pH-Optimum liegt bei 9,25 (Abb. 13).

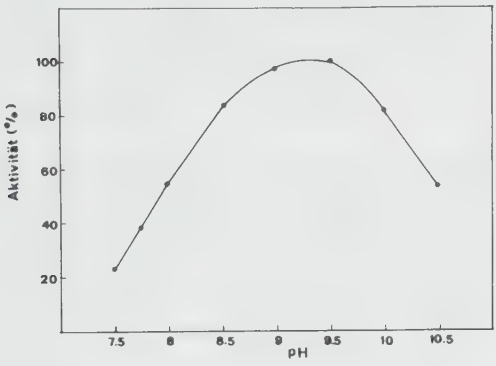



Abb. 13: Abhängigkeit der "neuen Prolin-Peptidasen"-Aktivität vom pH des Mediums.

## 3.3. Aktivitätsminderung durch Entzug von $Mn^{++}$-Ionen

Die Probe wurde gegen manganionen-freien Puffer über Nacht bei 7°C dialysiert. Als Restaktivität verbleibt ca. 60% "NPP"-Aktivität.

## 3.4. Einfluß von Inhibitoren

Die Inhibitionswirkung von Diisopropylfluorophosphat (DFP) und Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF), die spezifisch auf Serinreste wirken, und p-Chloromercuribenzoat (PCMB), das SH-Gruppen blockiert, wurde untersucht:

| | Konz. | pH | Restaktivität |
|---|---|---|---|
| DFP | 2,5 mM | 7,75 | 70% |
| PMSF | 2,5 mM | 7,75 | 70% |
| PCMB | 2,5 mM | 9 | 2% |

DFP und PMSF inhibieren nur gering, während PCMB die Aktivität vollkommen blockiert. Darin besteht ein deutlicher Unterschied zur Prolinase (vgl. Teil A.4.4) und zur LAP (Smith und Spackman, 1955).

## 3.5. Stabilität

Nach 40 Tagen Lagerung bei 4°C in Puffer ("Standardpuffer", s. Vers. 7) sind noch 80% Restaktivität vorhanden.

Nach Einfrieren bei -20°C im gleichen Puffer und anschließendem Auftauen bei 4°C bleiben noch 90% Restaktivität erhalten.

Eine Inkubation bei 40°C im gleichen Puffer hat keinen negativen Einfluß.

Das Enzym ist also wesentlich stabiler als Prolinase.

## 3.6. Spezifität

Diese Messungen wurden wie für Prolinase (s. Abschn. A. 4.6; Vers. 15) durchgeführt.

Auch bei diesen Spezifitätsuntersuchungen wurde vor allem die Spaltbarkeit von Prolin-Peptiden untersucht.

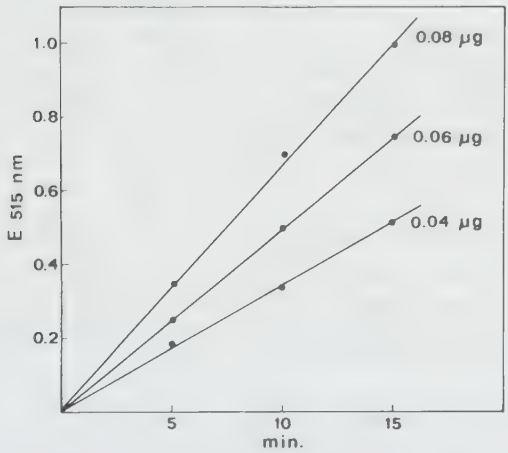



Abb. 14: Spaltung von Pro-LeuNH$_2$ durch die "neue Prolin-Peptidase"

Abb. 14 zeigt die Kinetik der Spaltung von Pro-LeuNH$_2$ bei Substratsättigung. Sie ist linear und proportional der eingesetzten Enzymmenge.

Tabelle 7:

Substratspezifität der "neuen Prolin-Peptidase"

| Substrate | rel.Spaltungs-geschwindigk. (Spaltg.Pro-$LeuNH_2$=100) | Meßmethode (s.Vers.15) |
|---|---|---|
| Pro - $LeuNH_2$ | 100 | a |
| Pro - $GlyNH_2$ | 2 | a |
| Pro - Val - Gly | 56 | a |
| Pro - Val - Asp | 21 | a |
| Pro - Gly - Gly | 7 | a |
| Pro - Pro - Gly | 0,1 | a |
| Pro - Leu - $GlyNH_2$ | 168 | a |
| Pro - Lys (Tos) - $GlyNH_2$ | 33 | a |
| Pro - Arg (Tos) - $GlyNH_2$ | 12 | a |
| Pro - Phe - His - Leu | 33 | a |
| Pro - Phe - Gly - Lys | 25 | a |
| Pro - Phe - Arg - Ser - - Val - Gln (2,5mM) | 9 | a |
| Pro - Gly - Phe - Ser - - Pro - Phe - Arg - Ser - Val - Gln(1mM) | 0,1 | a |
| PCA - Tyr | 0 | f |
| PCA - Tyr - Ser - Asp - - Lys - Gly - Val - - Ser - Ala - Gly - - Pro - Gly - Pro - - Hse | 0 | f |

Tabelle 8:

Spezifität der "neuen Prolin-Peptidase":

Prüfung auf Verunreinigung durch andere bekannte Nierenpeptidasen (vgl. Tab. 1).

| Substrate | rel.Spaltungsgeschwindigk. (Spaltung von Pro-Leu$NH_2$=100) | Meßmethode (s. Vers.15) |
|---|---|---|
| Poly - Pro | 0,1 | a |
| Pro - BNA (+) | 0,1 | a |
| Pro - Gly | 76 (0,9)$^{++}$ | a |
| Pro - Leu (+) | 3 (0,3)$^{++}$ | a |
| Gly - Pro - Hyp | 0 | d |
| Gly - Pro | 0,3 | b |
| Leu - pNA (+) | 1 | c |

(+) Substrat in Methanol gelöst

++ nach Einfrieren und Auftauen des Enzyms

Die in Tab. 7 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß N-terminales Prolin von Dipeptidamiden, Tripeptiden und ihren Amiden, aber auch von längeren Peptiden durch "NPP" abgespalten wird. Eine ausgeprägte Kettenlängenabhängigkeit ist dabei nicht erkennbar; dagegen hat die Aminosäure in 2. Position einen erheblichen Einfluß auf die Spaltungsgeschwindigkeit: diese ist besonders groß, wenn raumerfüllende, lipophile Reste (Leu, Val, Phe) oder Basen (Lys, Arg) die zweite Position einnehmen. Sind dagegen Glycin oder, besonders ausgeprägt, Prolin die carboxylseitigen Nachbarn des N-terminalen Prolins, sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit auf sehr niedrige relative Werte. Sogar der Aminosäurerest in Position 3 scheint noch Einfluß auf die Abspaltung des Prolins auszuüben (vgl. die relativen Spaltungsgeschwindigkeiten von Pro-Val-Gly und Pro-Val-Asp).

N-terminales PCA (Pyrrolidoncarbonsäure) kann nicht abgespalten werden, wie mit entsprechenden Testpeptiden, Fragmenten des Kollagens*, gezeigt werden konnte.

Das Präparat der "NPP", das für die Spezifitätsuntersuchungen verwendet wurde, enthält außer Prolinase nur sehr wenig Aktivität bekannter Fremdproteasen (Tab. 8). Wie ein Versuch mit eingefrorenem und wieder aufgetautem Enzym zeigte, kann "NPP" jedoch durch dieses sehr

*) erhalten von Dr. Timpl, Abt. Kühn

einfache Verfahren fast vollständig von der zunächst noch in größeren Mengen vorhandenen Prolinase-Aktivität befreit werden (Tab. 6).

Ob "NPP" andere N-terminale Aminosäuren abspalten kann, wurde aus Materialmangel ebensowenig untersucht, wie die Frage, ob bei den vorliegenden Substraten eine Hydrolyse über die erste Peptidbindung hinaus erfolgte.

## 4. Diskussion

Bei der "neuen Prolin-Peptidase" handelt es sich um ein bisher unbekanntes Enzym, das mit der Proliniminopeptidase (Sarid et al., 1962) die Abspaltung N-terminalen Prolins gemeinsam hat, jedoch Polyprolin und Pro-BNA nicht angreift. Seine Moleküleigenschaften sind ähnlich wie die der LAP und der Prolinase. Von ersterer läßt es sich jedoch eindeutig durch eine andere subzelluläre Verteilung, durch das Verhalten bei Fällungsprozessen und durch die Hemmung mit p-Chloromercuribenzoat abgrenzen. Von Prolinase unterscheidet sich die "NPP" ebenso eindeutig durch eine erheblich größere Stabilität, durch das chromatographische Verhalten an basischen Ionenaustauschern und gleichfalls durch seine Eigenschaft als SH-Enzym (Hemmbarkeit mit p-Chloromercuribenzoat). Wenn seine Spezifität bis jetzt auch nur lückenhaft bekannt ist, dürfte es für die Proteinstrukturchemie durch seine auffallende Eigenschaft, N-terminales Prolin abzuspalten, von Interesse sein.

Ob die "NPP" in vivo beim Kollagenabbau beteiligt ist, erscheint nach den vorliegenden Ergebnissen zweifelhaft. Pro-Pro-Gly erwies sich als sehr schlechtes Substrat. Die Freisetzung von Prolin aus längeren Ketten des Typs $(Gly\text{-}Pro\text{-}R)_n$, im Anschluß an die Abspaltung des Glycins durch X-Prolyl-Aminopeptidase, dürfte also nur dann möglich sein, wenn die Position R nicht durch Hydroxyprolin besetzt ist.

Das bevorzugte Substrat der "NPP", $Pro\text{-}Leu\text{-}GlyNH_2$ ist als Inhibitor der Ausschüttung des Melanocytenstimulierenden Hormons (MSH) beschrieben worden (Nair et al., 1971). Dieses Tripeptidamid bildet die Seitenkette von Oxytocin und dürfte durch enzymatische Spaltung dieses Hormons freigesetzt werden. Durch Abbau des Inhibitors, $Pro\text{-}Leu\text{-}GlyNH_2$, könnte der "neuen Prolin-Peptidase" eine Regulationsfunktion im Hormonstoffwechsel zukommen.

# E X P E R I M E N T E L L E R  T E I L

**Versuch 1:** Messung der Prolinase-Aktivität durch Prolin-Bestimmung.
Lit.: Messer (1961)

Lösungen:

| | |
|---|---|
| 1. Substratlsg.: | 17,2 mg Pro-Gly (Schuchardt, München) pro ml Puffer (13mM Tris + 2mM Bernsteinsäure, pH 7,75). pH muß nachgestellt werden. Die Lösung ist 0,1 M an Pro-Gly. |
| 2. Säuregemisch: | 4 Vol. 6M Phosphorsäure + 6 Vol. Eisessig p.A. |
| 3. Reaktionsgem.: | 20 mg Ninhydrin pro ml Säuregemisch (unter Erwärmen bis höchstens 70°C lösen). Jeden Tag frisch herstellen. |
| 4. Prolinstandard-lösung: | 20 mg Prolin p.A.<br>135 mg Glycin p.A.<br>81,5 g TCA p.A.<br>ad 1000 ml mit Wasser. |
| 5. Glycin-Lösung: | 3,6 µ M/ml in Wasser. |
| 6. TCA-Lösung: | 6,25% (w/v) TCA p.A. in Wasser |

Enzymtest:

Inkubation: 0,05 ml Enzymlösung werden in ein 15 ml-Zentrifugengläschen gegeben; man läßt etwas vorwärmen und startet dann die Reaktion durch Zugabe von 0,05 ml Substrat-Lösung. Die Temperatur des Wasserbades beträgt 40°C. (Die Inkubationszeit ist meistens 7 min). Mit 0,5 ml TCA-Lösung wird die Reaktion gestoppt.

Farbreaktion: In ein Schliffglas werden gegeben:
0,5 ml Überstand des Testgemisches
0,5 ml Glycinlösung
1,0 ml Eisessig
1,0 ml Reaktionsgemisch

Nach Verschließen 30min in siedenes Wasserbad stellen. Nach Abkühlen nochmals Zugabe von 1 ml Eisessig. Als Blindwert dient eine ebenso behandelte TCA-Lösung. Der Substratwert (Ansatz ohne Enzym) wird von den Meßwerten abgezogen. Die Enzymlösungen selbst zeigen keine zusätzliche Extinktion. Bei jeder Messung wird Prolinstandardlösung mitgemessen. Photometriert wird bei 515 nm. - Zur Eichung s. Abb. 15.

Berechnung: Einheiten pro ml (U/ml) =
$E_{515} \cdot 1/t \cdot VF \cdot 9,85$

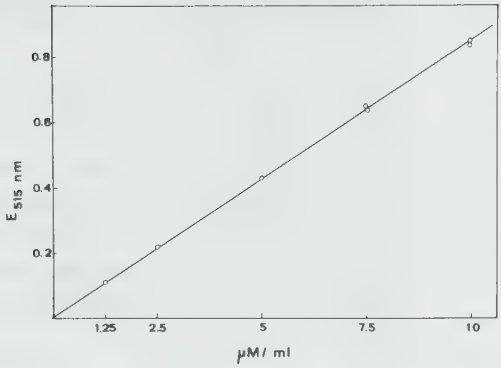



Abb. 15: Eichgerade für die Prolinbestimmung.

Versuch 2: Messung der Prolidase-Aktivität durch Prolin-Bestimmung.

Lösungen:

1. Substratlsg.: 8 mg Gly-Pro (Schuchardt) pro ml Puffer (13 mM Tris + 2 mM Bernsteinsäure, pH 7,75). pH muß nachgestellt werden. Die Substratlösung ist 46 mM an Gly-Pro.

2. - 6. siehe Versuch 1

7. 60 mM $MnCl_2$-Lösung in Puffer.

Enzymtest:

Vorinkubation: Zur Messung der vollen Prolidase-

Aktivität ist eine Vorinkubation von 60 min bei 40°C und einer $Mn^{++}$-Ionen-Konzentration von 20 mM notwendig (Davis und Smith, 1957). Die Aktivität steigt dabei zeitabhängig an und erreicht ein Plateau. Dafür werden 0.2 ml $MnCl_2$-Lösung + 0,1 ml Enzymlösung (entsprechend verdünnt) in einem 15 ml-Zentrifugengläschen 60 min vorinkubiert. Daraus werden 0,05 ml für die Inkubation entnommen.

Inkubation und Farbreaktion: siehe Versuch 1

Berechnung: Es ist ein weiterer Verdünnungsfaktor (3) zu berücksichtigen:
$U/ml = E_{515} \cdot 1/t \cdot 3VF \cdot 9,85$

Versuch 3: Messung der Leucin-Aminopeptidasen-Aktivität.
Lit. Informationsblätter der Fa. Boehringer, Mannheim

Lösungen:

1. Substratlsg.: 25 mM Leucin-p-Nitranilid (Serva, Heidelberg) in Methanol

2. Puffer: "Standardpuffer", s. Versuch 7.

Enzymtest:

Inkubation: 0,1 ml Enzymlösung (geeignet verdünnt) werden bei 40°C vorgewärmt. Gestartet wird mit 0,1 ml Substratlösung. Die Enzymreaktion wird mit 1 ml TCA-Lösung nach 30 min gestoppt. Nach Zugabe von 2 ml Puffer wird kurz zentrifugiert und der Überstand bei 405 mm photometriert.

Berechnung: Es ist ein Temperaturfaktor (2,5) zu berücksichtigen:
$mU/ml = E_{405} \cdot 108 \cdot 2,5$

Versuch 4: Proteinbestimmung
Lit.: Lowry et al., 1951

Lösungen:

1. Lösung: 20 g $Na_2CO_3$ (wasserfrei; p.A.Merck) + 0,5 g Na-Tartrat·$H_2O$ (p.A. Merck) + 100 ml 1 M NaoH ad 1000 ml Wasser lösen.

2. Lösung: 1 g $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ (p.A. Merck) ad 1000 ml Wasser lösen.

3. Lösung: 9 Teile Lösung 1 + 1 Teil Lösung 2 (stets frisch herstellen).

4. Lösung: 1 Teil Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck) + 2 Teile Wasser.

Test: Zu 0,5 ml Proteinlösung (5-100 ug) 2,5 ml von Lösung 3 geben und gut durchmischen. 10 min stehen lassen; dann 0,25 ml von Lösung 4 zupipetieren, sofort mischen. Nach genau 30 min bei 750 nm photometrieren (s. Abb. 16).

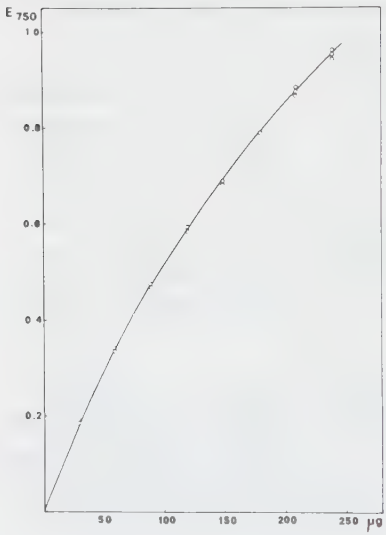



Abb. 16: Eichkurve für die Proteinbestimmung nach Lowry (aufgestellt mit getrocknetem Rinderserumalbumin, von P. Dehm, 1969)

Versuch 5: Gewinnung des Homogenates und Präzipitation mit CETAB.
Lit.: Himmelhoch u. Peterson, 1968

1. Homogenisieren:

16 · 50 g schlachtfrischer Schweinenieren-Cortex werden in je 200 ml Puffer (= 13 mM Tris + 2 mM Bernsteinsäure + 2mM $MnCl_2$ + 250 mM Saccharose; pH 7,75) 30 sec bei 7°C im Braunmixer bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert.
Das Volumen beträgt etwa 4 000 ml.

2. Präzipitation mit CETAB.

10 g CETAB (Serva) werden in 100 ml Puffer (s. Vers. 5/1) bei ca. 40°C gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 20-25°C wird die 10%-ige Lösung zum Homogenat, das im Eisbad gerührt wird, pipettiert. Nach 15 min wird 20 min bei 23 300 g und 4°C zentrifugiert (Sorvall RC 2, 1 2000rpm mit Rotor GSA). Der Überstand wird über Hyflo-Super-Cel (Serva) zur Entfernung der Fettreste vorsichtig im Eisbad abgenutscht.
Das Volumen beträgt etwa 3 400 ml.

Versuch 6: Relative Verteilung der Enzymaktivitäten im Cytoplasma und in den Zellpartikeln.

Etwa 200 ml des Homogenates werden 90 min bei 100 000 g und 4°C zentrifugiert (Beckman, Modell L 2-65 B, 36 000 rpm, Rotor 42). Nach Abdekantieren und Volumenbestimmung des Überstandes wird der Niederschlag in der 5-fachen Menge Puffer (s.Vers.5/1) aufgenommen. Die Enzymaktivitäten werden im Homogenat, Überstand und Präzipitat bestimmt.

Versuch 7: Chromatographie an DEAE-Cellulose. Lit.: Whatman Information Leaflet IL 2

Material: DEAE-Cellulose DE-52, microgranular, pre-swollen, der Fa. Whatman (W. & R. Balston Ltd., Maidstone, England) Säulenrohr aus Plexiglas (6 · 35 cm) mit 2 Adaptern.

Vorbereitung der Cellulose:

Bei Verwendung der vorgequollenen Cellulose entfällt das "Precycling". Die in Wasser suspendierte Cellulose wird mit Bernsteinsäure auf pH 4,5 gebracht und entgast. Dabei wird $CO_2$ entfernt. Mit Tris wird daraufhin pH 7,75 eingestellt. Äquilibriert wird in etwa 2,5 l "1o-fach Puffer" (= 130 mM Tris + 20 mM Bernsteinsäure + 2mM $MnCl_2$, pH 7,75); danach wird mit etwa 10 l "Standardpuffer" (= 13 mM Tris + 2 mM Bern-

steinsäure + 2 mM $MnCl_2$, pH 7,75) gewaschen. Beim Entfernen der feinen Partikel wird zur Berechnung der Sedimentationszeit ein Wert für n von ca. 1,7 verwendet.

Säulenfüllen:

Die Gelsuspension wird in die Säule gefüllt. Wenn sich ein kurzes Gelbett gebildet hat, wird der Säulenlauf geöffnet und vorsichtig weitere Suspension eingefüllt. Die Säule wird mit einem Adapter verschlossen und im Kühlraum bei 7°C mit ca. 2 l Startpuffer (= "Standardpuffer") äquilibriert.
Das Bettvolumen beträgt etwa 18 • 6 cm.

Durchführung der Trennung:

3 400 ml CETAB-Überstand werden von unten nach oben aufgetragen, danach wird mit etwa 2 l Startpuffer nicht adsorbiertes Protein ausgewaschen. Eluiert wird mit dem folgenden linearen Gradienten:
700 ml Startpuffer ("Standardpuffer", s. oben)
700 ml Grenzpuffer (= Startpuffer + 0,2 M NaCl) u. anschl.
300 ml Grenzpuffer.
Fließgeschwindigkeit: 720 ml/h
Fraktionsvolumen: 15 ml
Volumen der vereinigten Enzymfraktionen: 184 ml.

Versuch 8: Fraktionierte Äthanolfällung

Es wird eine Lösung von 2 mM $MnCl_2$ in Äthanol ("reinst", vergällt mit Petroläther) hergestellt. 100 ml der auf etwa -70°C gekühlten Lösung werden unter Rühren zu 184 ml "DEAE-Eluat" getropft (35 Vol%). die Enzymlösung im Eisbad erreicht etwa eine Temperatur von -7°C. Nach 20 min Rühren wird das ausgefallene Protein 60 min bei 48 200 g und -4°C zentrifugiert (Sorvall RC2, 20 000 rpm mit Rotor SS 34). Zum Überstand (265 ml) werden dann 310 ml Äthanol getropft (55 Vol%). Nach 20 min Rühren wird 60 min lang wie oben zentrifugiert. Das Präzipitat wird in 60 ml aufgenommen und ca. 30 sec in einem Potter-Elvehjem-Teflon-Homogenisator unter Eiskühlung homogenisiert. Die milchige Suspension wird 30 min lang bei 48 000 g und 4°C zentrifugiert (Sorvall RC 2, Rotor 42, 20 000 rpm).
Das Volumen des klaren Überstandes beträgt 60 ml.

Versuch 9: Rechromatographie an DEAE-Cellulose

Cellulose-Typ und ihre Vorbereitung s. Vers. 7.
Säule: 2,5 · 45 cm mit 2 Adaptern, z.B. Typ K 25/45 M, Pharmacia.

Durchführung der Trennung:

Auf die Säule mit dem Bettvolumen 2,5 · 10 cm werden von unten nach oben 60 ml der Enzymfraktion von Vers. 8 bei 7°C gepumpt. Danach wird mit etwa 100 ml

"Standardpuffer" (s. Vers. 7) gewaschen. Mit folgendem linearen Gradienten wird eluiert:
450 ml Startpuffer ("Standardpuffer", s. Vers. 7)
450 ml Grenzpuffer (= Startpuffer + 0,3 M NaCl).
Fließgeschwindigkeit: 150 ml/h
Fraktionsvolumen: 7 ml
Volumen der vereinigten Enzymfraktionen: 107 ml.

Versuch 10: Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

31,2 g fein pulverisiertes Ammoniumsulfat werden mittels eines Vibrationsspatels sehr langsam (etwa 2 h) zu 107 ml "DEAE-Eluat" (s. Vers. 9) gegeben. Das entspricht einer 50%-igen Sättigung. Die Lösung wird dabei ständig im Eisbad gerührt. 20 min nach Ende der Zugabe wird 30 min bei 48 200 g und 4°C das ausgefallene Protein abzentrifugiert (Sorvall RC 2, 20 000 rpm, Rotor SS 34). Zum klaren Überstand (ca. 118 ml) werden weitere 23 g Ammoniumsulfat wie oben (in etwa 1,5 h) gegeben, was einer 80%-igen Sättigung entspricht. Nach 20 min Rühren wird wieder zentrifugiert. Das Präzipitat wird mit "Standardpuffer" (s. Vers. 7) zu einem Volumen von 2,2 ml gelöst.

Nach folgender Formel läßt sich die jeweils zu verwendende Salzmenge berechnen:

$$g\ AS = \frac{V \cdot 1{,}77 \cdot (\text{Endkonzentr.} - \text{Anfangskonzentr.})}{354 - \text{Endkonzentr.}}$$

Versuch 11: Gelfiltration an Sephadex G-200
Lit.: Informationsblätter der Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden.

Vorbereitung des Materials:

Sephadex G-200 wird 5 h lang in "Standardpuffer" (s. Vers. 7) im Wasserbad erhitzt, dann werden die feinsten Teile durch mehrmaliges Absaugen entfernt. Die Suspension wird dann entgast.

Säulenabmessungen: 1,5 · 120 cm (mit Fritte)

Füllen der Säule:

Auf der Säule wird ein Trichter angebracht; die Gelsuspension wird dann in die Säule gegossen, die zu einem Drittel mit entgasten Puffer gefüllt ist, und zwar ist die Konzentration so zu wählen, daß Luftblasen aufsteigen können. Die Gelsuspension im Trichter wird gerührt. Nach Ausbildung eines kurzen Gelbettes wird Puffer von unten mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 10 ml/h abgepumpt. Die Säule wird bei Zimmertemperatur gefüllt, die Trennläufe werden im Kühlraum bei 7°C ausgeführt.

a. Durchführung der Trennung:

Auftragsvolumen: 2,2 ml von Vers. 10
Bettvolumen: 1,5 · 115 cm
Fließgeschwindigkeit: 10 ml/h
Fraktionsvolumen: 5 ml
Volumen der vereinigten Enzymfraktionen: 30 ml.

b. Molekulargewichtsbestimmung der Prolinase und der "neuen Prolin-Peptidase":

Substanzen:

1. Myoglobin (Koch-Light-Laboratories, Colnbrook: Bucks; England) MG 17 000
2. Rinder-Serumalbumin (Serva, Heidelberg) MG 67 000
3. $\gamma$-Globulin (Dr. Gollwitzer, Abt.Kühn) MG 160 000
4. Katalase (Kunz, Abt. Hannig) MG 240 000
5. Prolinase reinstes Präparat
6. "Neue Prolin-Peptidase" reinstes Präparat
7. Blue Dextran 2 000 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) zur Bestimmung von $V_o$

Die Eichsubstanzen werden in 2,2 ml Puffer gelöst (0,05%ige Lösung). Durchführung der Trennung wie bei a. Die $V_E$-Werte für Prolinase und die "neue Prolin-Peptidase" werden enzymatisch bestimmt, der $V_E$-Wert für Blue Dextran 2 000 photometrisch bei 625 nm und der anderen Eichsubstanzen (1-4) bei 280 nm.

Versuch 12: Chromatographie an QAE-Sephadex
Lit.: Informationsblätter der Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden.

Material: QAE-Sephadex A-50 der Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden;
Säulenrohr: 1 · 20 cm mit 2 Adaptern

Vorbereitung des Austauschers:

Das Material wird mit 0,5 N NaOH versetzt und mit Wasser bis zu neutraler Reaktion gewaschen; dann wird mit 0,5 N HCl und nochmals mit Wasser gewaschen. Anschließend wird mit "Standardpuffer" (s. Vers. 7) + 0,15 M NaCl äquilibriert. Die feinen Partikel werden dann sehr sorgfältig entfernt.

Durchführung der Trennung:

30 ml des Eluats aus Versuch 11a werden mit NaCl bis zu einer Konzentration von 0,15 M versetzt. Nach Auftragen auf die Säule (mit dem Bettvolumen 1 · 10 cm) wird mit dem folgenden linearen Gradienten von oben nach unten bei 7°C eluiert:
100 ml Startpuffer (= "Standardpuffer" + 0,15 m NaCl)
100 ml Grenzpuffer (= "Standardpuffer" + 0,25 m NaCl)
Durchflußgeschwindigkeit: 10 ml/h,
Fraktionsvolumen: 3,5 ml,
Volumen der gesammelten Enzymfraktionen: bei der Reinigung von Prolinase und von der "neuen Prolin-Peptidase" jeweils 30 ml.

Versuch 13: Immunelektrophorese

Herstellung eines Antiserums

Lit.: Leskovitz und Waksman (1960)

| | |
|---|---|
| Tiere: | 1 männliches Kaninchen (2,5-3 kg) |
| Adjuvans: | komplettes Freund-Adjuvans (Difco, Detroit, Mich/USA) |
| Antigen: | 4 ml "DEAE-Eluat" aus Versuch 7 werden mit dem Adjuvans im Verhältnis 1 : 1 vermischt. |

Immunisierung:

| | |
|---|---|
| 1. Tag: | 8 ml Antigenlösung (20 mg Protein) werden subcutan an mehreren Stellen injiziert. |
| 15. Tag: | 4 ml Immunogen (ohne Adjuvans) wird intraperitoneal geboostert. |
| 21. Tag: | Blutentnahme aus der Ohrvene zur Bestimmung des Antikörpertiters mittels Geldiffusion nach Ouchterlony (s. unten). Beim Titer 1 : 16 waren die schwächeren Präzipitatslinien nicht mehr sichtbar. Obiges Immunisierungsschema wurde deshalb wiederholt. |

Gewinnung des Serums:

Das Tier wurde unter Evipannarkose (ca. 50 mg Evipan-Natrium/kg Lebendgewicht) mittels Carotiskatheder entblutet. Das in Zentrifugengläschen aufgefangene Blut läßt man über Nacht stehen. Nach Ablösen des Blutkuchens wird in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand (Antiserum) wird in Ampullen bei ca. -40°C gelagert.

Geldiffusion nach Ouchterlony und Immunelektrophorese

Lit.: Ouchterlony, 1962; Graber et al., 1953; Scheidegger, 1955; Firmenschrift der Fa. LKB, Stockholm, Schweden)

Apparatur: Immunelektrophorese-Ausrüstung, LKB 6800 A

Herstellung der Agargel-Schicht:

Michaelis-Puffer: 9,82 g Veronal-Natrium
6,48 g Natrium-Acetat · 3 $H_2O$
35 ml 1N HCl
ad 1 l mit Wasser (pH 8,7)

Agar-Lösung: 1,4 g Agar, (Reinagar, Bering-Werke, Marburg/Lahn)
25 ml Michaelis-Puffer
75 ml Wasser
10 mg Thiocid (ASID-Institut,Mü.) als Antiseptikum.

Die Mischung wird im siedenden Wasserbad erhitzt, bis

eine klare Lösung entstanden ist.

Geldiffusion nach Ouchterlony

In ein zentrales Loch einer Agarplatte wird Antigenlösung, in die anderen ringförmig angeordneten Löcher Antiserum in verschiedenen Konzentrationen pipettiert. Nach Diffusion (etwa 24 h) in einer Feuchtigkeitskammer wird das nicht präzipitierte Protein mit 1%-iger NaCl-Lösung unter mehrmaligem Wechsel etwa 24 h ausgewaschen. Zum besseren Erkennen kann bei 37°C getrocknet und anschließend mit Amidoschwarz 10 B gefärbt werden (6 g/l in Methanol : Eisessig : Wasser = 45 : 10 : 45). Der nicht gebundene Farbstoff wird mit dem Lösungsmittel entfernt.

Immunelektrophorese

In eine Rahmenhälfte (3 Objektträger) werden 15 ml Agarlösung pipettiert. Nach Erstarren werden Löcher und Rinnen eingestanzt. In die Löcher wird Antigenlösung gegeben (50 ug Protein). Die Agarschicht wird über Filterpapierstreifen mit dem Elektrodenpuffer (je 700 ml Michaelis-Puffer) leitend verbunden.
Spannung: 250 V, Laufzeit: 90 min
Nach der Elektrophorese wird in die ausgehobenen Rinnen Antiserum pipettiert.
Weiter wird wie bei der Geldiffusion verfahren.

Versuch 14: Diskelektrophorese
Lit.: Ornstein, 1964; Davis, 1964; Vorschrift der Fa. Pleuger, Wijnegem, Belgien.

Pufferlösungen:

Elektrodenpuffer: 3 g Tris/l
14,4 g Glycin
auf 100 ml auffüllen, pH 8,9 (mit NaOH eingestellt); für die Elektrophorese 10-fach verdünnt.

Gelpuffer: 40 g Tris/l, ph 8,0 (mit HCl eingestellt).

Lösungen für das Gel (7,5%):

1. 30,0 g Acrylamid (Serva, Heidelberg)
   0,8 g N,N-Methylenbisacrylamid (Serva, Heidelberg)
   ad 100 ml mit Gelpuffer
2. 1,6 g Dimethylaminopropionitril (Schuchardt, Mü.)
   ad 100 ml mit Gelpuffer
3. 0,04 g Kaliumferricyanid (p.A., Merck)
   ad 100 ml mit Gelpuffer
4. 0,48 g Ammoniumperoxodisulfat (p.A., Merck)
   ad 100 ml mit Gelpuffer.

Die Lösungen 1-3 sind bei 4°C etwa 3 Wochen halbar, Lösung 4 etwa 5 Tage.

Die vier Lösungen werden im Verhältnis 1:1:1:1 gemischt und kurz evakuiert. Die in die Röhrchen

(6 · 65 mm) eingefüllte Mischung wird so mit Gelpuffer überschichtet, daß kein Meniskus entsteht. Die Polymerisation geht bei Tageslicht und Zimmertemperatur vor sich und ist nach etwa 45 min beendet. Auf die von Puffer befreite Oberfläche wird die Proteinlösung gebracht und mit einer Spatelspitze Saccharose versetzt. Nach Einsetzen der Röhrchen in die Elektrophoreseapparatur und vorsichtigem Einfüllen des Elektrodenpuffers wird der Strom eingeschaltet.

Trennbedingungen:

| | |
|---|---|
| Strom: | 4 mA pro Röhrchen |
| Auftragsmenge: | 0,300 mg bei nicht reduzierter Probe<br>0,075 mg bei reduzierter Probe |
| Trenndauer: | 2,5 h |
| Laufrichtung | von (-) nach (+) |
| Anfärbung: | 5 min in Amidoschwarz 10 B-Lösung (1 g pro 100 ml 7%-iger Essigsäure) |
| Entfärbung: | mit 7%-iger Essigsäure |

Versuch 15: Untersuchung der Spezifität

Diese Untersuchungen wurden stets unter Bedingungen einer Reaktion 0.Ordnung durchgeführt, die eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf der Basis von µ Mole Spaltprodukt/min ermöglichen. Die Substratkonzentration im Test lag immer im Sättigungsbereich (zwei mögliche Ausnahmen: s. Tab. 7), nämlich zwischen 12

und 50 m Mol. Im einzelnen wurden folgende Versuchsbedingungen gewählt (s. Tab. 4, 5, 7 und 8):

a) Prolin-Bestimmung (s. Vers. 1)
b) Prolin-Bestimmung (s. Vers. 2)
c) LAP-Bestimmung (s. Vers. 3)
d) Glycin-Bestimmung (s. Vers. 16)
e) Hydroxyprolin-Bestimmung (s. Stegemann, 1958)
f) Aminosäureanalyse

Bei sehr geringen Spaltungsraten mußte erheblich länger (bis zu 1 h) inkubiert werden als in den einzelnen Versuchen angegeben.

Versuch 16: Glycin-Bestimmung
Lit.: Dehm und Nordwig, 1970 a

Lösungen:

| | |
|---|---|
| Phosphat-Puffer: | 20% (w/v) $KH_2PO_4$ (p.A., Merck) in Wasser, mit fester KOH (p.A., Merck) auf pH 5,5 bringen. |
| Ninhydrinlösung: | 1% (w/v) Ninhydrin in Wasser (kühl aufbewahren, ca. 14 Tage haltbar). |
| 12,5 M Schwefelsäure: | 2 Teile konz. Schwefelsäure (95 - 97%; p.A. Merck) zu 1 Teil Wasser geben. |
| Chromotropsäurelösung: | 400 mg Chromotropsäure (p.A., Merck) in 40 ml Wasser lösen, dann mit 12,5 M Schwefelsäure auf 200 ml auffüllen. |

Glycin-Standard-Lösung: 1 mM Glycin (p.A. Merck) in 5%-iger (w/v) wässeriger TCA.

Farbreaktion:

In ein Schliffglas werden gegeben:
0,3 ml des Überstandes
0,1 ml Phosphat-Puffer
0,1 ml Ninhydrin-Lösung
30 min kochen; nach Abkühlen 5 ml Chromotropsäure-Lösung zupipettieren, nochmals 30 min auf 100°C erhitzen. Blindwert (5%-ige TCA-Lösung) und Substratwert werden von den Meßwerten abgezogen. Photometrieren bei 570 nm.

Berechnung: $U/ml = E_{570} \cdot 1/t \cdot VF \cdot 15,9$

Versuch 17: Messung der Aktivität der "neuen Prolin-Peptidase" durch Prolinbestimmung

Substratlösung: 12,6 mg Pro-Leu$NH_2$ (Cyclo-Chemical, Los Angeles/USA) pro ml Puffer (13 mM Tris + 2 mM Bernsteinsäure pH 7,75). pH muß nachgestellt werden. Die Lösung ist 0,1 M an Pro-Leu$NH_2$.

Sonst wie Versuch 1.

## Z U S A M M E N F A S S U N G

Die vorliegende Dissertation vertieft die Kenntnisse über prolinspezifische Peptidasen aus Schweineniere. Diese proteolytischen Enzyme sind für das Verständnis katabolischer Prozesse im Säugerorganismus von großem Interesse, sie hydrolysieren ausschließlich (oder vorwiegend) prolinhaltige Peptidsequenzen, stellen also spezielle Werkzeuge des Proteinstoffwechsels dar.

1.a) Die Iminodipeptidase ("Prolinase"), aus der Literatur als nur wenig gereinigtes Enzym bekannt, konnte erstmals hoch angereichert werden.

Das hierfür ausgearbeitete Verfahren umfaßt folgende Aufarbeitungs- und Reinigungsoperationen: Fällung der partikulären Bestandteile des Homogenates mit Cetyltrimethylammoniumbromid; Chromatographie des Überstandes an DEAE-Cellulose; fraktionierte Fällung mit Äthanol; Rechromatographie an DEAE-Cellulose; Ammoniumsulfat-Fraktionierung; Gelfiltration an Sephadex G-200; Chromatographie an QAE-Sephadex.

Der Anstieg der spezifischen Prolinase-Aktivität durch diese Reinigungsprozesse war etwa 450-fach. Dies ist wahrscheinlich eine Mindestzahl, denn das Enzym ist außergewöhnlich labil. Aktivitäts- und Proteinausbeute sind gering.

b) Immunelektrophoretische und diskelektrophoretische Untersuchungen zeigten, daß das gewon-

nene Prolinasepräparat zwar nicht völlig, aber doch im wesentlichen frei von Verunreinigungen ist. Dies wurde vor allem auch durch Spezifitätsuntersuchungen mit einer großen Zahl von Testpeptiden bestätigt.

c) Die Prolinase hat ein Aktivitätsoptimum bei pH 8,75, wird durch Manganionen aktiviert und durch Serininhibitoren in hoher Konzentration gehemmt. Das Molekulargewicht wurde zu etwa 300 000 bestimmt. Es liegen Hinweise dafür vor, daß die Peptidase aus mehreren identischen Untereinheiten besteht.

d) Die Wirkungsweise der Prolinase ist hochspezifisch. Sie spaltet nur Dipeptide und zwar der Struktur Pro-X.

Prolin kann durch 4-Hydroxyprolin zwar ersetzt werden, jedoch sinkt die relative Spaltungsgeschwindigkeit dann stark ab; ältere Literaturangaben zu diesem Punkt sind also zu korrigieren. Ob Prolin gegen andere Aminosäuren austauschbar ist, konnte in den vorliegenden Untersuchungen nicht endgültig geklärt werden. Die Position X kann von vielen Aminosäuren eingenommen werden, die Spaltungsraten der einzelnen Substrate schwanken allerdings in weiten Grenzen.

2.a) Das für Prolinase ausgearbeitete Reinigungsverfahren erlaubt auch die Isolierung einer bis jetzt unbekannten Schweinenieren-Peptidase,

die vorläufig als "neue Prolinpeptidase" ("NPP") bezeichnet wird. Die Anreicherung dieses Enzyms ist etwa 200-fach.

b) Die "NPP" hat ein pH-Optimum bei 9,25 und ist ein manganionen-abhängiges, stabiles SH-Enzym. Für das Molekulargewicht wurde ein Wert von etwa 300 000 ermittelt.

c) Das gewonnene Präparat enthält noch größere Mengen Prolinase (deren Aktivität wegen ihrer großen Labilität leicht zerstört werden kann), ist aber sonst praktisch frei von anderen Prolinpeptidasen. "NPP" spaltet N-terminales Prolin ab, wenn das Substrat länger als ein Dipeptid ist; es stellt also gewissermaßen die Ergänzung zur Prolinase dar. Die Natur des Aminosäurerestes in 2. Position hat jedoch einen sehr großen Einfluß auf die Spaltungsgeschwindigkeit.

# L I T E R A T U R

Binkley, F., F. Leibach, N. King,
Arch. Biochem. Biophys. 128, 397 (1968)

Davis, B.J., Ann.N.Y.Acad.Sci., 121, 404 (1964)

Davis, N.C., u. E.L. Smith,
J.Biol.Chem. 200, 373 (1953)

Davis, N.C., u. E.L. Smith,
J.Biol.Chem. 224, 261 (1957)

Dehm, P., Dissertation, München 1969

Dehm, P. u. A. Nordwig,
Eur.J. Biochem. 17, 364 (1970a)

Dehm, P. u. A. Nordwig,
Eur.J. Biochem. 17, 372 (1970b)

Fruton, J. S. u. Bergmann, M.,
J. Biol. Chem. 130, 19 (1939)

Graber, P., u. C.A. Williams,
Biochem. Biophys.Acta, 10, 193 (1953)

Graßmann, W., J. Engel, K. Hannig, H. Hörmann, K. Kühn u. A. Nordwig,
Fortschr. Chem. org. Naturstoffe (Wien) 23, 195 (1965)

Graßmann, W., O.v. Schoenebeck u. G. Auerbach,
Z. physiol. Chemie, 210, 1 (1932)

Hanson, H., P. Hermann, W. Blech,
Z. phys. Chemie, 315, 201 (1959)

Himmelhoch, S.R. u. Peterson, E.E.,
Biochemistry 7, 2085 (1968)

Hopsu-Havu, V.K., Rintola, P. u. Glenner, G.G.,
Acta Chem. Scand. 22, 299 (1968)

Kirschke, H. u. H. Hanson,
Z.phys. Chemie, 350, 1437 (1969)

Kirschke, H., J. Lasch, H. Hanson,
Z. phys. Chem. 350, 1449 (1969)

Leskowitz, S. u. B. Waksman,
J. Immunol., 84, 58 (1960)

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr u. R.J. Randall,
J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)

Mäkinen, K.K., A. Chem. Scand. 23, 1409 (1969)

Melius, P., M.H. Moseley u. D.M. Brown,
Biophys. Acta, 221, 62 (1970)

Messer, M., Analyt. Biochem., 2, 353 (1961)

Nair, R.M.G., A.J. Kastin u. A.V. Schally,
Biochem. Biophys. Res. Comm.,
43, 6 (1971)

Neuman, R.E. u. E.L. Smith,
J.Biol. Chem. 193, 97 (1951)

Nordwig, A., Z. phys.Chemie, 349, 1353 (1968)

Nordwig, A., Adv.in Enzymology 34, 321 (1964)

Ornstein, L., Ann.N.Y.Acad.Sci.,121, 321 (1964)

Ouchterlony, O., "Progress in Allergy", Vol. VI,
Karger, Basel, 30 (1962)

Sarid, S., A. Berger u. E. Katchalski,
J.Biol.Chem., 237, 2207 (1962)

Scheidegger, J.J., Int.Arch. Allergy Appl.Immunol.,
7, 103 (1955)

Shapiro, A.L. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 28,
815 (1967)

Smith, E.L., u. D.H. Spackman,
J. Biol. Chem., 212, 271 (1955)

Stegemann, H., Z. phys. Chemie, 311, 41 (1958)

Wachsmuth, E.D., J. Fritze u. G. Pfleiderer,
Biochemistry, 5, 169 (1966)

Wakabayashi, D., J.Biochem.(Tokyo) 55, 244 (1964)

Yaron, A. u. D.Mlynar, Biochem. Biophys. Res. Comm.,
32, 658 (1968)

## Lebenslauf

Ich wurde am 28. Juni 1939 als Sohn von Ludwig Mayer, Schreiner, und seiner Ehefrau Walburga, geb. Leichtle, in Ehekirchen, Kreis Neuburg/Do., geboren.

Nach Besuch der Volksschule (1945-50) und der hum. Gymnasien in Kempten (1950-1952) und Dillingen/Do. legte ich 1961 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1961/62 und Sommersemester 1962 studierte ich Philosophie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München.
Ab Wintersemester 1962/63 begann ich das Studium der Biologie, Chemie und kath. Theologie. Ein Semester (SS 1966) ging ich an die Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.
Im April 1968 legte ich das Staatsexamen für das Lehramt an höheren Schulen in Biologie, Chemie und kath. Theologie ab.

Im August 1968 begann ich die Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München.

Ab Sommersemester 1971 bin ich an der Staatswirtschaftlichen Fakultät der Universität München immatrikuliert.